

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt Universität zu Berlin

Dissertation

„Der Einfluß von proinflammatorischen Zytokinen und Cyclosporin A auf die intra- und extrafollikuläre Expression von Neurotrophinen und ihrer Rezeptoren am Haarfollikel“

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt Universität zu Berlin

von

Holger Bläsing
aus: Berlin

Dekan: Prof. Dr. med. Joachim W. Dudenhausen

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. R. Paus

2. PD Dr. rer. Nat. U. Herz

3. Prof. Dr. med. T. Zuberbier

Datum der Promotion: 28. Februar 2002

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungen	6
1	Zusammenfassung.....	7
2	Einleitung.....	9
2.1	Neurotrophine und Zytokine am Haarfollikel - Hintergrund und Stand des Wissens.....	9
2.2	Haarfollikel	10
2.2.1	Anatomie und Zyklus des Haarfollikels	10
2.2.2	Bedeutung des Haarzyklus	14
2.2.3	Morphogenese der Haarfollikel.....	17
2.3	Neurotrophine.....	19
2.3.1	Die Familie der Neurotrophine.....	19
2.3.2	Die Rezeptoren der Neurotrophine.....	19
2.3.3	Die Funktionen der Neurotrophine.....	22
2.3.4	Neurotrophine und Haarwuchsmodulierung	24
2.4	Zytokine.....	27
2.4.1	Die Familie der Zytokine	27
2.4.2	Funktionen der Zytokine	27
2.4.3	Die Rezeptoren der Zytokine.....	29
2.4.4	Die Zytokine IL-1 β , IFN- γ und TNF- α	31
2.4.5	Neurotrophine und Zytokine - eine Verbindung zwischen Nervensystem und Immunsystem	32
2.4.6	Zytokine und Haarwuchsmodulierung	33
2.5	Cyclosporin A und Dexamethason - Immunmodulatoren mit Wirkung auf Zytokine und Haarwuchs	34
2.6	Das C57BL/6-Mausmodell.....	35
2.7	Herleiten der Fragestellung	36
2.8	Zielsetzung	39
2.9	Untersuchungsstrategie.....	39

3	Material und Methoden	41
3.1	Tiermodell	41
3.1.1	Die C57BL/6-Maus	41
3.1.2	Haltung der Tiere	41
3.1.3	Induktion von Anagen durch Depilation	42
3.2	Zytokinapplikation	44
3.3	Systemische CsA-Behandlung	46
3.4	Topische Dexamethason-Gabe	47
3.5	Verarbeitung der Haut	49
3.5.1	Hautentnahme	49
3.5.2	Herstellen der Kryostatschnitte	50
3.6	Neurotrophine - Immunhistochemie	51
3.6.1	Beschreibung der verwendeten Färbemethoden	51
3.6.2	Durchführung der Immunfluoreszenz	52
3.6.3	Durchführung der ABC-Färbung	55
3.7	Auswertung der Präparate	57
4	Ergebnisse	60
4.1	In der Kontrollgruppe zeigten sich für jedes Neurotrophin spezifische Färbemuster	60
4.2	Verschiedene Zytokine regulieren NGF in ÄWS und HM hoch	63
4.3	Der Zytokincocktail reguliert p75 NTR in der DP hoch	65
4.4	Der Zytokincocktail reguliert NT-3 und NT-4 in der Epidermis hoch	66
4.5	Der Zytokincocktail reguliert NT-4 in Zellen von ÄWS und HM hoch	66
4.6	CsA erhöht die NGF-Expression in ÄWS und HM	68
4.7	Dexamethason bewirkt keine Veränderungen des NT-Musters	69
5	Diskussion	73
5.1	Modellbetrachtung	73
5.1.1	Fragestellung und Methodik	73
5.1.2	Mögliche Schlußfolgerungen	74
5.1.3	Grenzen und Mängel des Modells	75

5.2	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	76
5.3	Interpretation der Resultate.....	77
5.3.1	NGF	77
5.3.2	P75 NTR.....	78
5.3.3	NT-3	78
5.3.4	NT-4	79
5.3.5	Cyclosporin A.....	80
5.3.6	Dexamethason	80
5.4	Andere Interaktionen von Neurotrophen und Zytokinen in der Haut	81
5.5	Bedeutung für die Haarforschung	82
5.6	Bedeutung für die Pathophysiologie der Haut.....	82
5.7	Asymmetrische Verteilung von NGF in der Haarmatrix	83
5.8	Ausblick.....	84
6	Literaturverzeichnis.....	85
	Danksagung	97
	Lebenslauf.....	98
	Publikationsliste	99
	Eidesstattliche Erklärung.....	100

Verzeichnis der häufiger verwendeten Abkürzungen:

ÄWS	äußere Wurzelscheide des Haarfollikels
BDNF	„brain-derived neurotrophic factor“
CsA	Cyclosporin A
Dexa	Dexamethason
DP	dermale Papille
HM	Haarmatrix
IFN- γ	Interferon- γ
IL-1 β	Interleukin-1 β
IR	Immunreaktivität
IWS	innere Wurzelscheide des Haarfollikels
NGF	„nerve growth factor“
NT-3, -4	Neurotrophin-3 und -4
p. d.	post depilationem
p75 NTR	p75 Neurotrophinrezeptor
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
Trk-A,-B,-C	Tyrosinkinaserzeptor-A, -B, -C

1 Zusammenfassung

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob es einen Zusammenhang zwischen den Zytokinen einerseits und den Neurotrophinen andererseits in ihrer Wirkung auf das Haarwachstum gibt. Cyclosporin A (CsA) und Dexamethason wurden wegen ihrer potenten antiinflammatorischen und wachstumsmodulierenden Wirkungen am Haarfollikel als Vergleichssubstanzen ebenfalls untersucht.

In früheren Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, daß Haarfollikel sowohl Produktionsort als auch Ziel von verschiedenen Zytokinen und Neurotrophinen sind. Zytokine ihrerseits verändern die Expression von Neurotrophinen in verschiedenen Geweben und Organen.

Neurotrophine sind eine Familie von eng verwandten Polypeptiden, nämlich NGF (nerve growth factor), BDNF (brain-derived neurotrophic factor), NT-4 und NT-3 (Neurotrophin-4 und -3). Sie entfalten ihre Wirkung über die spezifischen Tyrosinkinaserzeptoren Trk-A (NGF), Trk-B (NT-4, BDNF) und Trk-C (NT-3). Dagegen stellt p75 NTR einen unspezifischen Rezeptor dar, an dem alle Neurotrophine mit geringerer Affinität binden.

Die Neurotrophine NT-3, NT-4 und BDNF wirken auf das Haarwachstum, indem sie die Rückbildungsphase (Katagen) des Haarfollikels einleiten. NT-3 und NGF beschleunigen die Morphogenese des Haarfollikels. Über p75 NTR wird eine Inhibition der Morphogenese und eine Induktion von Katagen vermittelt.

Die Zytokine IL-1 β (Interleukin-1 β) und TNF- α (Tumornekrosefaktor- α) sind potente Inhibitoren des Haarwachstums. Die gleiche Wirkung besitzt auch Dexamethason.

IFN- γ (Interferon- γ) ist ebenfalls an der Inhibition von Haarwachstum beteiligt. Dagegen kann CsA die Phase des aktiven Haarwachstums (Anagen) induzieren.

Um den Zusammenhang zwischen der Wirkung der Zytokine einerseits und der der Neurotrophine andererseits auf das Haarwachstum zu studieren, wurde untersucht, inwiefern IL-1 β , TNF- α bzw. IFN- γ das intra- und extrafollikuläre Verteilungsmuster der verschiedenen Neurotrophine und ihrer Rezeptoren verändern. Der Einfluß von CsA, welches seinerseits auf die Expression verschiedener Zytokine wirkt, und Dexamethason, welches auf die Expression von Zytokinen und Neurotrophinen wirkt, wurde ebenfalls untersucht.

Zu diesem Zweck wurde das C57BL/6-Maus-Modell benutzt. Damit war es möglich, an einem etablierten Tiermodell für das Haarwachstum eine Betrachtung der Interaktionen von Zytokinen, CsA und Dexamethason mit den Neurotrophinen *in vivo* vorzunehmen. Nach Applikation der Zytokine (intradermal), Cyclosporin A (intraperitoneal) bzw. Dexamethason (topisch) wurde

nach Herausbildung von Anagen VI in der Mehrzahl der Haarfollikel die Haut geerntet. Mittels Durchführung immunhistochemischer Färbungen wurde das Verteilungsmuster der Neurotrophine und ihrer Rezeptoren evaluiert.

Durch semiquantitative Auswertung der Präparate und Vergleich zwischen Kontrolltieren und behandelten Tieren konnte dann eine Aussage über die Veränderung des Neurotrophinmilieus *in vivo* gewonnen werden:

Alle drei untersuchten Zytokine sowie ein Cocktail von IL-1 β , TNF- α und IFN- γ regulierten die NGF-Immunreaktivität (IR) in der proximalen äußeren Wurzelscheide (ÄWS) und in der Haar-matrix (HM) von Anagen-VI-Haarfollikeln hoch. Der Zytokincocktail regulierte ebenfalls sehr deutlich die NT-3- und NT-4-IR in der murinen Epidermis hoch. Zusätzlich erhöhte dieser Cocktail die NT-4-IR in spezifischen Zellpopulationen von HM und proximaler ÄWS sowie die p75 NTR-Expression in der dermalen Papille (DP). Interessanterweise erhöhte die Behandlung mit CsA in gleicher Weise wie IL-1 β , TNF- α , IFN- γ und der Zytokincocktail die NGF-IR in HM und proximaler ÄWS. Dexamethason bewirkte in dieser Arbeit keine Veränderungen der Expression von Neurotrophinen bzw. ihrer Rezeptoren.

Somit gibt es Evidenz dafür, daß Zytokine *in vivo* direkt oder indirekt auf den Neurotrophin-haushalt der Haarfollikel und der Epidermis einwirken. Der Einfluß der Zytokine auf die Expression von Neurotrophinen ist somit auch in dem Organsystem Haut wahrscheinlich von funktioneller Bedeutung. Dies könnte ein weiteres Indiz für das Zusammenspiel von Nerven- und Immunsystem in der Haut sein. Unterstrichen wird dies durch den interessanten Einfluß der immunmodulatorischen Substanz CsA auf die Neurotrophin-Expression. Es stellt sich schließlich die Frage, ob nicht zumindest einige der haarwuchsmodulierenden Effekte, die für IL-1 β , TNF- α , IFN- γ und CsA beschrieben sind, mit einer Veränderung der Neurotrophin-Expression des Haarfollikels im Zusammenhang stehen könnten.

2 Einleitung

2.1 Neurotrophine und Zytokine am Haarfollikel - Hintergrund und Stand des Wissens

In früheren Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, daß Haarfollikel sowohl Produktionsort als auch Wirkungsort vieler haarwuchsmodulierender Zytokine und Neurotrophine sind¹⁻¹³. Da für einige Zytokine bekannt ist, daß sie die *In-vitro*-Expression von Neurotrophinen in verschiedenen Zellen und Geweben verändern können¹⁴⁻¹⁸, stellte sich die Frage, ob die follikuläre Expression der Neurotrophine von Zytokinen auch *in situ* verändert werden könnte. Neurotrophine sind eine Familie eng verwandter Polypeptide. Zunächst wurden vor allem ihre essentiellen Funktionen bei der Herausbildung und Funktion des Nervensystems beschrieben¹⁹, aber in letzter Zeit wird auch über wichtige Aufgaben außerhalb des Nervensystems berichtet. Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang die Entdeckung, daß Neurotrophine in Säugetierhaut als Wachstumsmodulatoren wirken²⁰⁻²².

Die einzelnen Mitglieder der Neurotrophin-Familie sind: Nervenwachstumsfaktor (nerve growth factor - NGF), Gehirnneurotrophischer Faktor (brain-derived neurotrophic factor - BDNF), Neurotrophin-4 (NT-4) und Neurotrophin-3 (NT-3). Ihre hochaffinen Rezeptoren sind die Tyrosinkinaserzeptoren Trk-A (NGF), Trk-B (BDNF, NT-4) und Trk-C (NT-3). Der p75 Neurotrophinrezeptor (p75 NTR) wurde als gemeinsamer niedrigaffiner Rezeptor beschrieben. Allerdings sind kürzlich auch spezifische Funktionen dieses Rezeptorproteins entdeckt worden, und zwar bei der Kontrolle des programmierten Zelltodes^{23,24} und bei der Morphogenese von Haarfollikeln⁷.

In Experimenten an Organkulturen menschlicher Haarfollikel konnte gezeigt werden, daß die Zytokine Interleukin-1 β (IL-1 β) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) potente Inhibitoren des Haarwachstums sind⁹⁻¹³. Auch konnte in unbehandelten Alopezia-areata-Läsionen ein erhöhter Spiegel von Interferon- γ (IFN- γ) und IL-1 β nachgewiesen werden^{10,11}. Das immunsuppressive Medikament Cyclosporin A sowie das immunsuppressiv und antiphlogistisch wirkende Dexamethason hemmen die Produktion zahlreicher Zytokine²⁵⁻²⁸. Beide sind ebenfalls potente Modulatoren des Haarwachstums. Cyclosporin A induziert das Wachstumsstadium (Anagen) der Haarfollikel und unterdrückt gleichzeitig die Herausbildung der Rückbildungsphase (Katagen)²⁹⁻³². Dexamethason dagegen induziert Katagen in Haarfollikeln von Mäusen, ein Effekt, der durch die Gabe von Cyclosporin A verhindert werden kann^{32,33}. Dexamethason hat auch Einfluß auf die

Produktion von Neurotrophinen³⁴⁻³⁶. Für Cyclosporin A konnte ein derartiger Einfluß auf die Neurotrophinproduktion bisher nicht gezeigt werden.

Mittlerweile sind auch für Neurotrophine zahlreiche Interaktionen mit dem Haarzyklus bei Mäusen beschrieben: NT-3, BDNF und NT-4 beschleunigen die Herausbildung von Katagen, und NT-3 sowie NGF beschleunigen die Morphogenese³⁻⁶. Auch p75 NTR und Trk-C sind für die Morphogenese der Haarfollikel von Bedeutung^{7,8}.

Somit ist es sinnvoll zu fragen, ob nicht zumindest einige der haarwuchsmodulierenden Eigenschaften der genannten Zytokine und Immunsuppressiva in Zusammenhang mit gleichzeitig stattfindenden Veränderungen des Neurotrophinmilieus in der Haut und besonders im Haarfollikel stehen. Außer in einem Rattenmodell für entzündungsinduzierte Hyperalgesie^{37,38} ist der Zusammenhang zwischen proinflammatorischen Zytokinen bzw. antiinflammatorischen Immunsuppressiva und Neurotrophin- bzw. Neurotrophinrezeptorexpression in der Haut noch nicht untersucht worden. Diesem möglichen Zusammenhang sollte in dieser Arbeit nachgegangen werden.

2.2 Haarfollikel

2.2.1 Anatomie und Zyklus des Haarfollikels

Haarfollikel sind Miniorgane der Haut, die für die Produktion von Haaren, speziellen Hornfäden, die besonders reißfest und mit Pigmenten durchsetzt sind, verantwortlich zeichnen. Die Haare dienen bei Tieren vor allem als Kälteschutz und mechanische Barriere sowie als Schutz vor UV-Strahlung. Beim Menschen, der nur in einigen Regionen des Körpers dicke und stark pigmentierte Terminalhaare besitzt, dienen sie eher der sozialen Kommunikation. Vellushaare, die den Rest des menschlichen Körpers bedecken, sind im Gegensatz zum Terminalhaar kaum pigmentiert und besitzen keine lufthaltige Medulla (siehe **Abb. 2**).

Man kann den Follikelapparat grob in einen permanenten und einen transienten Teil unterteilen (siehe **Abb. 1**). Der permanente Teil bleibt während der zyklischen Vorgänge im wesentlichen unverändert, während der transiente sehr starken Veränderungen unterworfen ist.

Die Haarfollikel bestehen mehrheitlich aus spezialisierten Epithelzellen, nur die dermale Papille ist mesenchymaler Natur. Die dermale Papille ist für die Steuerung verantwortlich. Im proximalen epithelialen Anteil, v.a. in der Haarmatrix (HM), wird das Haar produziert. Die

innere Wurzelscheide (IWS) dient wahrscheinlich als Trichter, der die nach außen drängenden Keratinozyten bündelt und in Position bringt. Sie wird durch die äußere Wurzelscheide (ÄWS) ernährt und evtl. reguliert (siehe **Abb. 3**).

Auf der Höhe der Insertion des M. arrector pili, des für die „Gänsehaut“ verantwortlichen Muskels, verbreitet sich die ÄWS zu einem Wulst, der wahrscheinlich Sitz der Stammzellen ist, aus denen sich die übrigen epithelialen Anteile des Haarfollikels herleiten können³⁹.

Vor allem über der Kuppe der dermalen Papille sind Melanozyten angesiedelt, die über lange Dendriten ihre Melanosomen in die Keratinozyten der Haarmatrix transportieren. Typ und Menge des produzierten Melanins bestimmen dann, welche Farbe das Haar annimmt^{40,41}.

Der Haarfollikel ist ein Organ, das während seines gesamten Lebens einem ständigen Wechsel von massiver Proliferation bzw. terminaler Differenzierung (Anagen), Organrückbildung (Katagen) und Ruhestadium (Telogen) unterliegt (siehe **Abb. 5**)⁴²⁻⁴⁵.

Während des Anagens, der Wachstumsphase, geschieht die eigentliche Haarproduktion. Es kommt zunächst zum Aufbau und zur vollen Reifung des Haarfollikels, wobei die Zellen der Wulstregion eine wichtige Rolle spielen. Dann ist der Follikel bereit, durch ständige Proliferation der epithelialen Zellen das Haar zu produzieren. Dieses Stadium kann in sechs Unterstadien eingeteilt werden (Anagen I-VI), die sich histologisch und in ihrer Produktivität unterscheiden. Während des darauffolgenden Katagens, der Rückbildungsphase, kommt es zum Proliferationsstop der Keratinozyten der Haarmatrix und die Melanozyten beenden die Produktion von Melaningranula. Das Wachstum des Haares kommt zum Stillstand. In den epithelialen Anteilen des Haarfollikels (ausgenommen die Stammzellregion) kommt es zu streng regulierten Rückbildungsvorgängen, bei denen der programmierte Zelltod eine wichtige Rolle spielt. Gegen Ende des Katagens verkleinert sich die dermale Papille, sie bewegt sich aufwärts und kommt nahe der Wulstregion zum Stillstand. Auch das Katagen kann nach histologischen Kriterien in weitere Unterstadien (Katagen I-VIII) eingeteilt werden.

Das Telogen ist das Ruhestadium, welches auf das Katagen folgt. Dabei bildet sich am proximalen Ende des Haares eine Verdickung, und es entsteht das sogenannte Kolbenhaar. Schließlich fällt das Kolbenhaar durch mechanische Vorgänge, wie z.B. Waschen oder Bürsten, aus, und das Anagen kann erneut eingeleitet werden^{43,45-49}.

In neuen Arbeiten wird noch als zusätzliches Stadium das Exogen genannt⁵⁰. Dieser Begriff beschreibt das aktive Herauslösen des alten Haares aus dem Follikel. Eine zeitliche Korrelation mit den Entwicklungsstadien des Haarfollikels ist dabei jedoch nicht unbedingt gegeben.

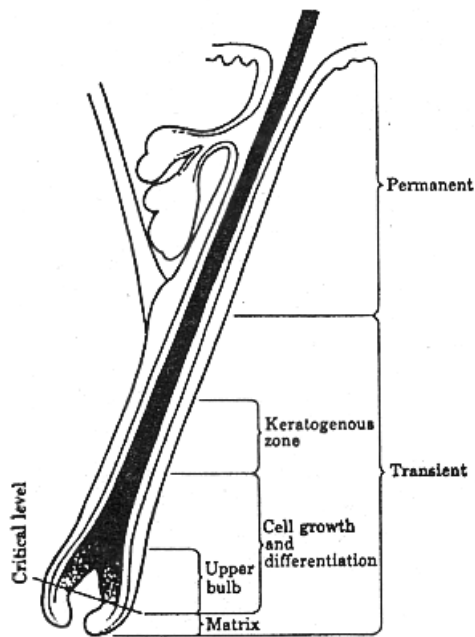


Abbildung 1: Einteilung des Haarfollikels

Der Follikel wird in einen permanenten und einen transienten Anteil eingeteilt. Letzterer besteht aus der keratogenen Zone, der Zone von Zellwachstum und Differenzierung sowie der Matrix.

Aus W. Montagna et al., 1958, siehe Referenz 48.

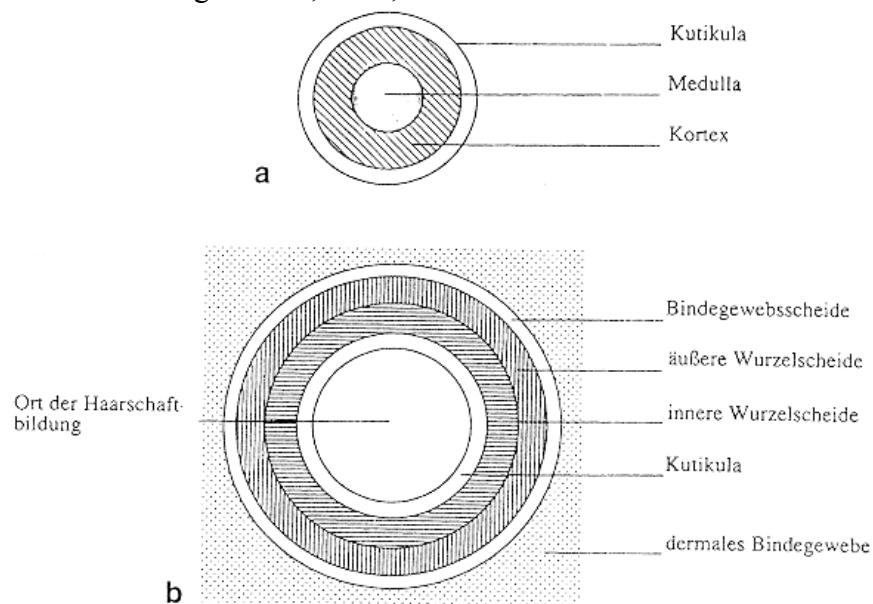


Abbildung 2: Querschnitte durch Haarschaft und Haarfollikel

a Querschnitt durch den außerhalb der Haut liegenden Haarschaft eines menschlichen Terminalhaares, b Querschnitt durch einen proximalen Anagenfollikel

Aus R. Paus et al., 1994, siehe Referenz 46.

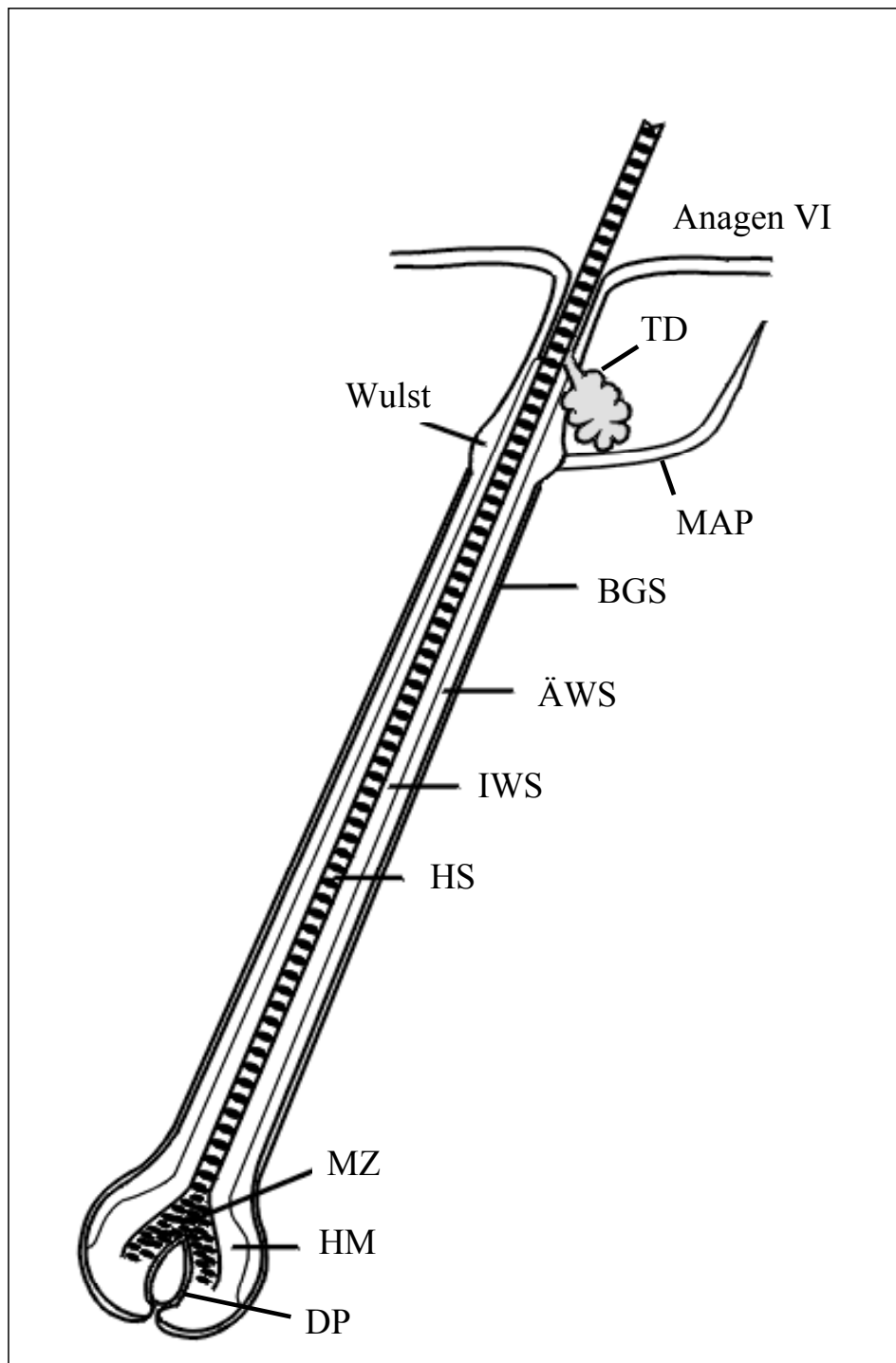


Abbildung 3: Anatomie des Haarfollikels

Abkürzungen: TD=Talgdrüse; MAP=M. arrector pili; BGS=Bindegewebsscheide; ÄWS=äußere Wurzelscheide; IWS= innere Wurzelscheide; HS=Haarschaft; MZ=Melanozyten; HM=Haarmatrix; DP=dermale Papille
Modifiziert nach R. Paus et al., 1999, siehe Referenz 49.

2.2.2 Bedeutung des Haarzyklus

Der Follikelapparat befindet sich, wie oben beschrieben, in einem ständigen Wechsel von Anagen, Katagen und Telogen. Die Länge der einzelnen Phasen kann sich stark unterscheiden. Bei einigen Tieren läuft der Zyklus synchronisiert ab (Mausern), auch beim Menschen ist eine gewisse Synchronisierung vorhanden. Das Anagen ist das längste Stadium. Es dauert beim Menschen zwei bis fünf Jahre, wogegen das Katagen nur ca. fünf Wochen und das Telogen ca. fünf Monate dauern. Die Dauer des Anagens bestimmt schließlich, welche Länge das Haar erreichen kann.

Die Bedeutung des Haarzyklus für die Haarforschung ist dadurch begründet, daß im Prinzip alle Erkrankungen der Haare, die nicht mit einer Zerstörung des Haarfollikels, wie z.B. bei den vernarbenden Alopezien, einhergehen, durch eine pathologische Verschiebung des Haarzyklus gekennzeichnet sind. Daher sind diese auch potentiell reversibel.

Bei der Alopecia areata wird beispielsweise durch ein entzündliches Infiltrat das Anagen abgebrochen, und es kommt zum Haarausfall an der betroffenen Stelle. Ist die Entzündung spontan zurückgegangen oder wurde sie mit Hilfe von Glucocorticoiden unterbrochen, beginnen wieder das Anagen und neuer Haarwuchs. Auch andere Erkrankungen wie androgenetische Alopezie und Haarausfall bei antineoplastischer Therapie sind somit potentiell heilbar. Deshalb ist ein wichtiges Ziel der Haarforschung, die für den Ablauf des Haarzyklus essentiellen Signale zu bestimmen und therapeutisch nutzbar zu machen (siehe **Abb. 4** und **Tab. 1**)^{43,46-53}.

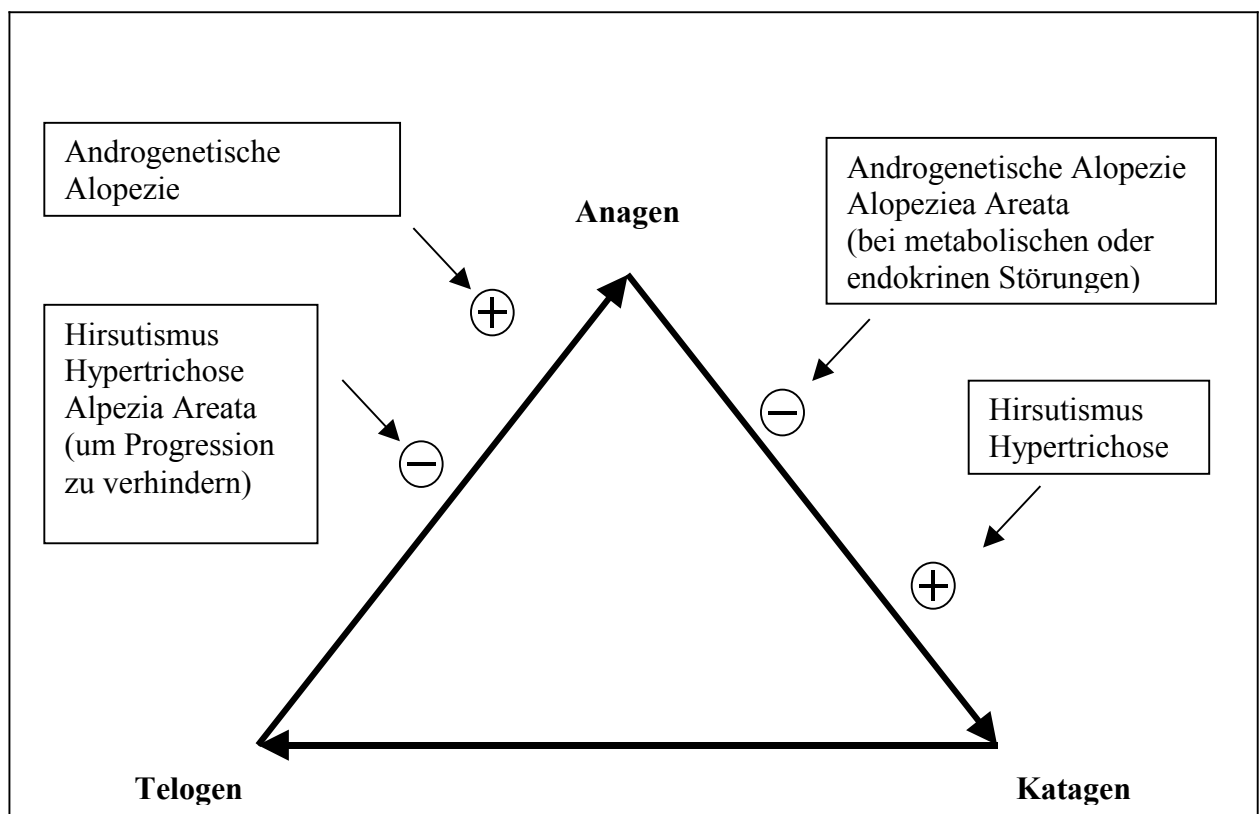


Abbildung 4: Strategien für die Behandlung und Prävention häufiger Haarerkrankungen

Das Pluszeichen symbolisiert eine Stimulation und das Minuszeichen eine Hemmung der jeweiligen Phase des Haarzyklus.

Aus R. Paus, 1996, siehe Referenz 47.

Tabelle 1: Modulatoren des humanen Haarzyklus

Modifiziert nach R. Paus et al., 1999, siehe Referenz 49.

Haarwuchsmodulatoren	Wirkung
<hr/>	
Endogen	
<hr/>	
Androgene	Verkleinerung der Follikel und verkürztes Anagen in Androgen-sensitiven Arealen der Kopfhaut (Skalp); Vergrößerung der Follikel in Androgen-abhängigen Arealen (Bart) während Adoleszenz
Östrogene	Verlängerung des Anagens; postpartaler Östrogenabfall führt zu Telogeneffluvium
Wachstumshormone	wirken synergistisch mit Androgenen während Adoleszenz
Prolactin	kann Hirsutismus verursachen
Thyroxin	Hypothyreose und evtl. Hyperthyreose verursachen Telogeneffluvium
<hr/>	
Exogen	
<hr/>	
anabole Steroide	wirken wie Androgene; beschleunigen androgenetische Alopezie und verstärken Hirsutismus
Östrogene	verlängern Anagen; wirken Telogeneffluvium und androgenetischer Alopezie entgegen
Finasterid	hemmt 5 α -Reduktase Typ II; hemmt Verkleinerung der Haarfollikel und verlängert Anagen von Androgen-abhängigen Arealen; wandelt Vellus- in Terminalfollikel um
Minoxidil	induziert und verlängert Anagen; wandelt Vellus- in Terminalfollikel um
orale Kontrazeptiva	Absetzen kann Telogeneffluvium bewirken
Phenytoin	Hypertrichose
Retinoide	können verfrühtes Katagen oder vorzeitigen Verlust des Kolbenhaares verursachen; Telogeneffluvium

2.2.3 Morphogenese der Haarfollikel

Bereits in utero werden durch Interaktionen vom Epithel mit dem darunterliegenden Mesenchym Haarfollikel gebildet. Bestimmte Signale der embryonalen Dermis lösen die Invagination des Epithels in Richtung des mesenchymalen Zellhaufens aus, aus welchem sich die dermale Papille entwickelt. Das Epithel umwächst dann die dermale Papille und bildet die Haarmatrix, aus der schließlich die einzelnen Wurzelscheiden des Anagenbulbus entstehen. Schon während dieser Periode werden die Verteilung und der zukünftige Phänotyp der Behaarung festgelegt. Diese Verteilung und die Anzahl der Haarfollikel ändern sich im Prinzip nach der Geburt nicht mehr. Die Morphogenese kann in acht Stadien unterteilt werden, wobei die letzten Stadien viele Gemeinsamkeiten mit dem Anagen besitzen. Nach zahlreichen Proliferationsvorgängen kommt es zur Haarproduktion, bis der Follikel schließlich mit dem Eintritt in das Katagen seinen lebenslangen Zyklus beginnt (siehe **Abb. 5**).

Eine fehlerhafte Morphogenese spielt zwar bei der Entwicklung von Erkrankungen des Haarkleides eine geringe Rolle, doch konnten aufgrund bestimmter Störungen der embryonalen Haarfollikelentwicklung durch genetische Defekte wertvolle Rückschlüsse auf Botenstoffe oder Gensignale gezogen werden, die auch bei Erkrankungen des Haarkleides wichtig sein könnten^{46,47,49}.

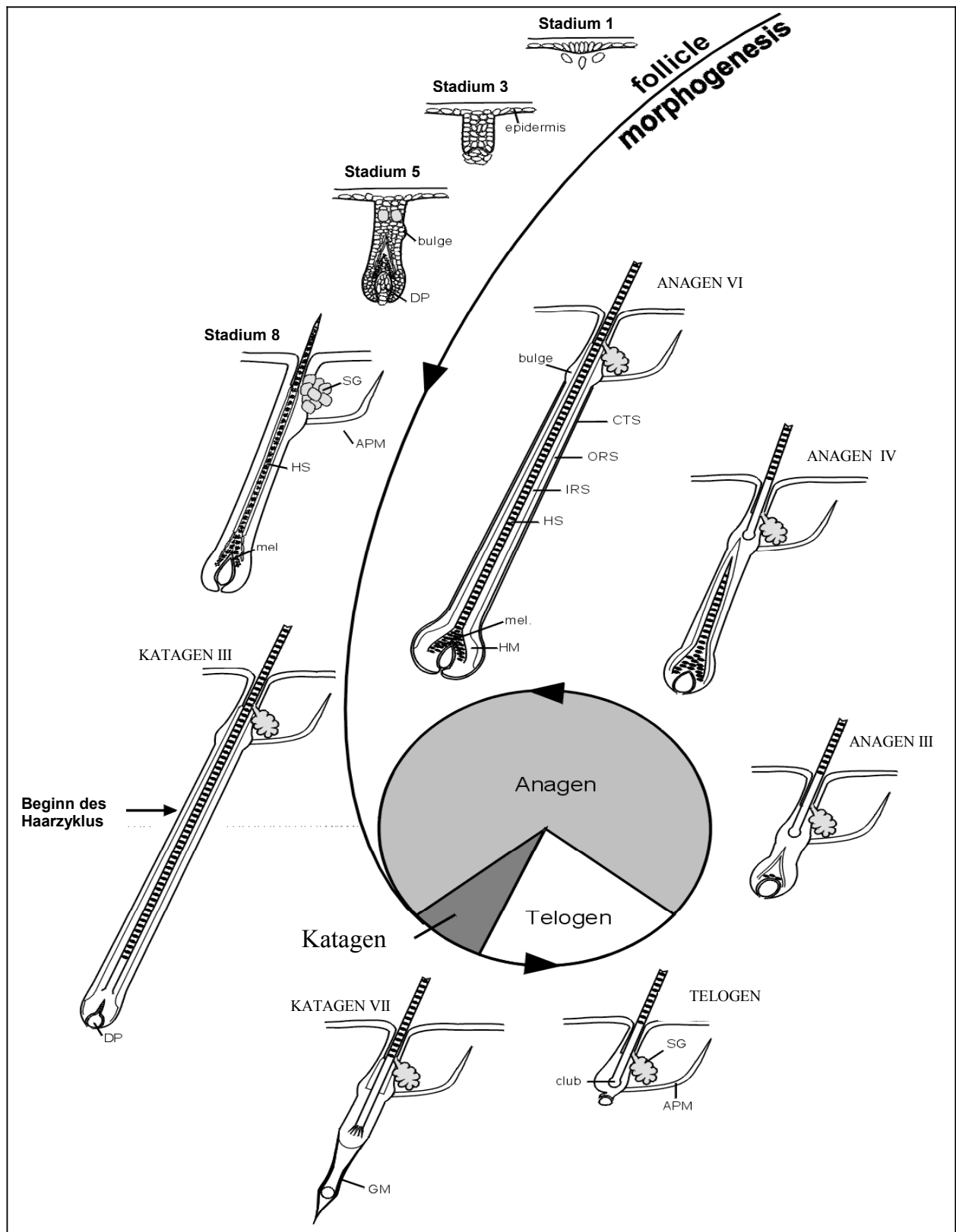


Abbildung 5: Entwicklung und Zyklus des Haarfollikels

Ausgewählte Stadien der Morphogenese und die drei Stadien des Zyklus (Anagen, Katagen, Telogen). Die römischen Ziffern bezeichnen morphologische Unterstadien von Anagen bzw. Katagen. Die Breite des Tortendiagramms repräsentiert jeweils die Zeit, für die sich der Haarfollikel in diesem Stadium befindet.

Modifiziert nach R. Paus et al., 1999, siehe Referenz 49.

2.3 Neurotrophine

2.3.1 Die Familie der Neurotrophine

Neurotrophine sind eine Familie von Proteinen mit ca. 50% Homologie untereinander. Sie liegen in ihrer aktiven Form als Homodimere⁵⁴ vor und werden im peripheren und zentralen Nervensystem exprimiert¹⁹. Sie spielen hier eine wesentliche Rolle bei der Regulation von Entwicklung, Überleben und Funktion der Nervenzellen¹⁹.

Der Nervenwachstumsfaktor (nerve growth factor - NGF) ist das bisher bestuntersuchte Mitglied dieser Familie⁵⁵. Weitere Mitglieder sind BDNF (brain-derived neurotrophic factor)⁵⁶, Neurotrophin-3 (NT-3)⁵⁷ und Neurotrophin-4 (NT-4)⁵⁸. Weiterhin gibt es GDNF (glial-derived neurotrophic factor)⁵⁹ sowie die bisher nur im Fisch nachgewiesenen Substanzen Neurotrophin 6 (NT-6)⁶⁰ und Neurotrophin 7 (NT-7)⁶¹.

2.3.2 Die Rezeptoren der Neurotrophine

Es sind zwei Arten von Neurotrophinrezeptoren bekannt, die sich durch ihre Affinität und Spezifität unterscheiden⁶².

Tyrosinkinaserzeptoren (Trk) sind spezifisch für bestimmte Neurotrophine und binden sie mit hoher Affinität⁶³. Drei Mitglieder der Trk-Familie wurden in Säugetieren identifiziert. Trk-A ist der Rezeptor für NGF, Trk-B für BDNF sowie NT-4, und Trk-C ist verantwortlich für NT-3 (siehe **Abb. 6**)⁶⁴.

Durch Versuche mit Knockout-Mäusen für bestimmte Trk-Rezeptoren konnte gezeigt werden, daß diese Rezeptoren essentiell für die Wirkung der Neurotrophine sind, wobei die Phänotypen dieser Mäuse den Tieren mit fehlendem entsprechenden Neurotrophin sehr ähnlich waren⁶⁵.

Die intrazelluläre Signaltransduktion verläuft ähnlich wie bei Tyrosinkinaserzeptoren anderer Wachstumsfaktoren⁶⁶. Nach Bindung des Liganden kommt es zur Autophosphorylierung des Rezeptors, und intrazelluläre Signalmoleküle wie Phospholipase C γ (PLC γ)⁶⁷ oder Phosphatidylinositol-3'-Kinase (PI3-Kinase)⁶⁸ werden aktiviert. Über weitere intrazelluläre Transduktionsschritte wird das Signal verstärkt, und die spezifische Wirkung kommt zum Tragen (siehe **Abb. 7**).

Der niedrigaffine Rezeptor p75 NTR bindet alle Neurotrophine gleich stark mit nur geringer Affinität⁶⁹⁻⁷¹. Er scheint seine Funktion vor allem im Zusammenhang mit den hochaffinen Rezeptoren zu erfüllen¹⁹. P75 NTR kann z.B. die Affinität der Tyrosinkinaserzeptoren erhöhen und damit indirekt auf die Interaktion der Neurotrophine mit diesen Rezeptoren einwirken^{62,72}. Allerdings wurden in letzter Zeit speziellere Funktionen von p75 entdeckt. So kann über p75 ein NGF-vermittelter Zelltod bestimmter Neuronen ausgelöst werden^{73,74}, und die Dopaminfreisetzung mesenzephaler Kulturen wird stimuliert⁷⁵. Die intrazelluläre Signaltransduktion erfolgt über Zeramid und NF- κ B (siehe **Abb. 7**).

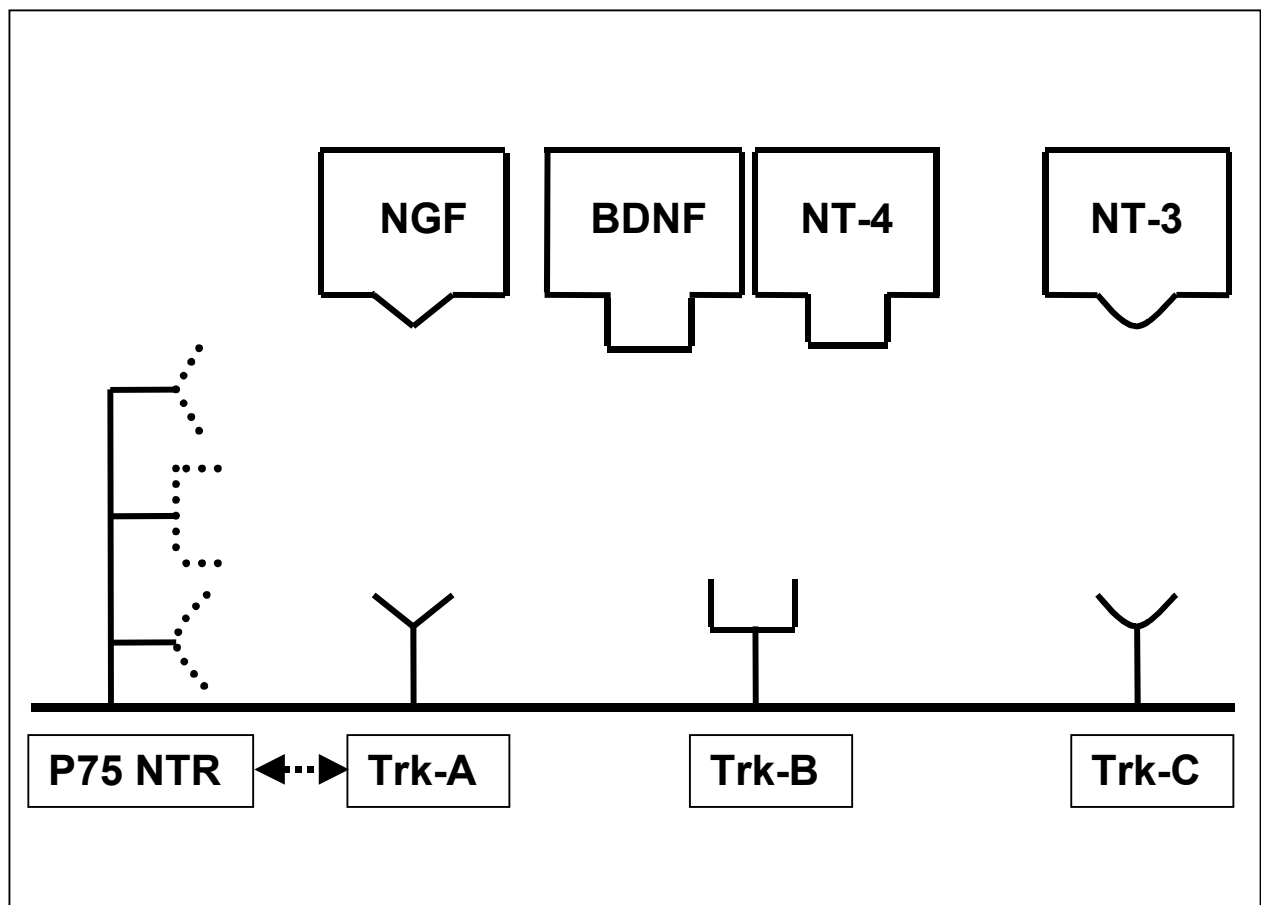


Abbildung 6: Die Mitglieder der Neurotrophinfamilie und ihre Rezeptoren

Trk-A ist der hochaffine Rezeptor für NGF, Trk-B für BDNF und NT-4, Trk-C für NT-3, p75 NTR ist ein niedrigaffiner Rezeptor für alle Neurotrophine, der mit den hochaffinen Rezeptoren in Wechselwirkung steht.

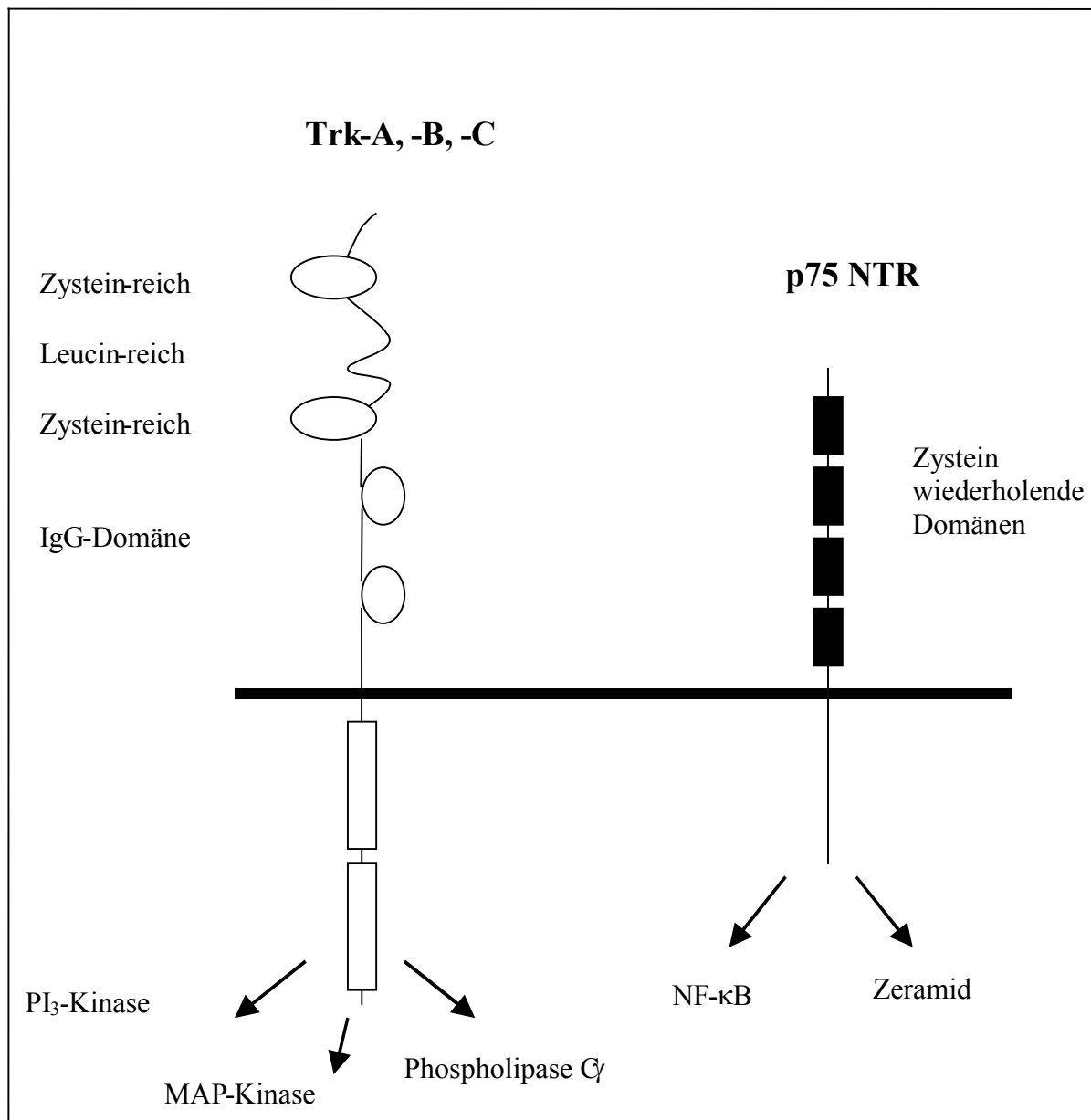


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Neurotrophinrezeptoren

Die Trk-Rezeptoren bestehen aus einem extrazellulären Anteil mit Wiederholungen von Leucin- oder Zystein-reichen bzw. IgG-Domänen. Die intrazelluläre Signaltransduktion erfolgt über die Phospholipase C γ , die MAP-Kinase sowie über die PI₃-Kinase. Der p75 Rezeptor besitzt eine extrazelluläre Zystein-reiche Domäne, die intrazelluläre Signaltransduktion erfolgt über Zeramid bzw. für NGF über NF- κ B.

Modifiziert nach H. Toenen, 1995, siehe Referenz 81.

2.3.3 Die Funktionen der Neurotrophine

Zunächst wurden die Neurotrophine vor allem als Wachstumsfaktoren beschrieben, die für das Überleben bestimmter Neuronen während der Embryonalperiode essentiell sind¹⁹. Diese Funktion spiegelt sich in ihrem Namen wieder. Darüber hinaus wurden später auch Funktionen im schon reifen, voll ausgebildeten Nervensystem entdeckt und schließlich auch viele Aufgaben, die sie außerhalb des Nervensystems erfüllen.

NGF als der am längsten bekannte Faktor ist in seiner Funktion im Nervensystem ausführlich untersucht worden. Als klassischer neurotropher Faktor ist er essentiell für das Überleben, die Entwicklung und die Differenzierung von peripheren Neuronen aus vegetativen und sensorischen Ganglien⁷⁶. NGF reguliert die Expression von Neuropeptiden in sensorischen Nervenzellen und ist bei der verstärkten Produktion von inflammatorischen Neuropeptiden im Nerv beteiligt⁷⁷.

BDNF ist ein Überlebensfaktor für sensorische und vegetative Nerven^{19,65}. Aber auch Ganglienzellen in der Retina⁷⁸ und Motoneuronen sind BDNF-abhängig⁷⁹, und BDNF wird zusammen mit NGF nach Läsionen peripherer Nerven vermehrt produziert⁸⁰. Es spielt eine wichtige Rolle bei der aktivitätsabhängigen Entwicklung okulärer Dominanzsäulen im visuellen Cortex. Zusammen mit NT-3 stimuliert es die Neurotransmitterfreisetzung im Hippocampus⁸¹. BDNF wirkt bei der Regulation der Aktivität GABA-enthaltender Neuronen in Neocortex und Hippocampus mit⁸². Bei der Langzeitpotenzierung im Hippocampus, die wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei Lernprozessen spielt, wird BDNF benötigt^{83,84}.

Für das Überleben von Neuronen des Hippocampus sowie anderer Regionen ist NT-3 notwendig⁸⁵. Auch vegetative, sensorische und motorische Neuronen sind NT-3-abhängig⁶⁵. NT-3 stimuliert die Differenzierung von Motoneuronen aus dem Neuralrohr und erfüllt wahrscheinlich einige andere Funktionen bei der Differenzierung im Nervensystem⁸⁶.

NT-4 reguliert zusammen mit NT-3 und BDNF das Überleben und die Funktion von Motoneuronen⁸⁷. Auch sensorische Nerven sind von NT-4 abhängig, wobei interessanterweise trotz des gleichen Rezeptors die BDNF-abhängigen Neuronen nicht unbedingt mit den NT-4-abhängigen übereinstimmen müssen^{88,89}, denn während BDNF-Knockout-Mäuse nur drei bis vier Wochen nach der Geburt überleben⁹⁰, sind NT-4-Knockout-Tiere normal vermehrungsfähig, zeigen aber eine Reduktion bestimmter sensibler Neuronen^{88,91}.

Insgesamt läßt sich feststellen, daß die Neurotrophine nicht nur die klassischen neurotrophen Funktionen (Differenzierung, Überleben, programmierter Zelltod von Neuronen) erfüllen, sondern auch in die physiologische Regulation von Synapsenfunktionen involviert sind⁹². Bei

degenerativen Erkrankungen des zentralen Nervensystems wie der Alzheimer oder der Parkinson Krankheit sind Neurotrophine wahrscheinlich an der Pathogenese beteiligt^{93,94}.

Der bisher nur experimentelle therapeutische Einsatz neurotropher Faktoren, z.B. bei peripheren Neuropathien⁹⁵, zeigt deren Potential als Medikamente und unterstreicht ihre Wichtigkeit im peripheren und zentralen Nervensystem.

Daß Neurotrophine nicht nur im Nervensystem wichtig sind, zeigte sich zunächst daran, daß sie in verschiedenen nicht-neuronalen Zellen innerhalb und außerhalb des Nervensystems nachgewiesen wurden⁹⁶⁻⁹⁹, interessanterweise auch in Fibroblasten und Keratinozyten^{100,101}. NT-3, das von Fibroblasten in menschlicher Haut produziert wird^{102,103}, konnte auch in Vibrissa-Haarfollikeln von Ratten nachgewiesen werden^{104,105}. NT-4 wurde in Epithelzellen gewöhnlicher Haarfollikel bei Ratten gefunden¹⁰⁶.

Neurotrophine wurden nicht nur in zahlreichen nicht-neuronalen Zellen und Geweben nachgewiesen, sondern es wurden auch bestimmte Funktionen außerhalb des Nervensystems dokumentiert. NT-3 ist essentiell für die Entwicklung des Herzens in der Embryonalperiode¹⁰⁷, und bei GDNF-Knockout-Mäusen wurde unter anderem über das vollständige Fehlen von Nieren und ableitenden Harnwegen sowie enterischem Nervensystem berichtet^{108,109}. Auch von NGF, NT-3 und BDNF wurde über eine wichtige Funktion bei der Morphogenese der Niere berichtet^{110,111}. An der Steuerung der Zahnentwicklung sind mehrere Neurotrophine maßgeblich beteiligt¹¹²⁻¹¹⁴. Außerdem wird aufgrund bestimmter räumlicher und zeitlicher Verteilungsmuster von NGF und p75 NTR in embryonalem Rattengewebe vermutet, daß NGF und auch die anderen Neurotrophine an der Morphogenese verschiedener anderer Organe beteiligt sind. Dies könnte z.B. bedeutsam für die Herausbildung der Gliedmaßen, aber auch innerer Organe wie Lunge oder Hoden sein¹¹⁵.

Schließlich wurde kürzlich für NGF, aber auch für BDNF, für GDNF und für NT-3, eine regulierende Funktion bei der Immunantwort vermutet, die vor allem die Interaktion der Immunzellen mit dem Nervensystem betrifft¹¹⁶ (siehe auch **2.4.5**). Therapeutisch könnte diese Interaktion für die Behandlung so verschiedener Erkrankungen wie Ulzerationen der Kornea oder Vaskulitiden nutzbar gemacht werden¹¹⁷.

2.3.4 Neurotrophine und Haarwuchsmodulierung

Sowohl das Nervensystem als auch die Haut entwickeln sich aus dem Ektoderm. Daher ist es nicht erstaunlich, daß es viele Verbindungen zwischen Nervensystem und Haut bzw. spezieller den Haarfollikeln gibt.

Das Nervensystem hat zahlreiche Einflußmöglichkeiten auf den Haarzyklus^{1,118,119}. Die sensible und autonome Innervation von Haarfollikeln sowie deren Substance P-Expression und Mastzell-Nerv-Interaktionen sind abhängig vom Wachstumsstadium des Follikels. Zudem konnte gezeigt werden, daß durch Substance P, ACTH und bestimmte Neuropeptide aus sensiblen Nerven das Anagen-Stadium induziert wird^{1,120}.

Der Haarwuchs wird durch sympathomimetische Substanzen moduliert¹²¹, und die sympathische Hautinnervation sowie die Expression von β_2 -Adrenorezeptoren in der Epidermis sind vom Haarzyklus abhängig¹²² (siehe **Abb. 8**).

Wie äußert sich nun das Zusammenspiel von Nervensystem und Haut über das System Neurotrophine?

NGF steuert in der Haut nicht nur die Entwicklung von sensibler und vegetativer Innervation¹²³⁻¹²⁵, sondern stimuliert auch die Proliferation von Keratinozyten und unterdrückt deren Apoptose^{2,126-129}. NGF konnte schon vor einigen Jahren in embryonaler Haut und Haarfollikeln nachgewiesen werden¹³⁰. NGF ist beteiligt an der Regulation von Entzündungs- und Reparaturprozessen in der Haut. Melanozyten können durch Zugabe von NGF vor einer UV-induzierten Apoptose geschützt werden²¹. BDNF, NT-3 und NT-4 stimulieren ebenfalls das Wachstum von Keratinozyten²².

An der Innervation der Haut und der Funktion verschiedener Mechanorezeptoren sind außer NGF auch BDNF, NT-3 und NT-4 beteiligt^{131, 132-135}.

Die spezifischen Wirkungen der Neurotrophine auf das Haarwachstum sind vielfältiger Natur. Durch Untersuchungen an Neurotrophin-Knockout- und überexprimierenden Mäusen sowie durch genauere Betrachtung von Verteilung und Quantität verschiedener Neurotrophine in der Haut bzw. in den Haarfollikeln während des Haarzyklus und die Behandlung von Hautorgan-kulturen mit Neurotrophinen wurden diese Wirkungen genauer beschrieben.

NT-3, BDNF und NT-4 beschleunigen die Ausbildung von Katagen^{4,5}. NT-3 und NGF beschleunigen die Morphogenese der Haarfollikel und werden schon in frühen Stadien in den Keratinozyten des sich bildenden Follikels exprimiert^{3,6}. Auf der anderen Seite wird durch die Deletion des NT-3 Rezeptors Trk-C die Morphogenese verlangsamt⁸, ein Hinweis dafür, daß

auch bei der Haarwuchsmodulierung durch Neurotrophine die Tyrosinkinaserzeptoren eine wesentliche Aufgabe erfüllen.

Der p75 Rezeptor spielt ebenfalls während der Morphogenese eine wichtige Rolle. P75 NTR wird schon in frühen Phasen der Haarfollikelentwicklung in der dermalen Papille exprimiert, ist dort jedoch in späteren Phasen nicht mehr nachweisbar und findet sich dann in der äußeren Wurzelscheide. Bei P75-Knockout-Mäusen kommt es zu einer Beschleunigung der Morphogenese, was auf eine inhibierende Funktion dieses Rezeptors in diesem Zusammenhang hinweist⁷.

In einem weiteren Experiment wurde gezeigt, daß es bei p75-defizienten Mäusen im Vergleich zu genetisch unveränderten Tieren zu einer signifikanten Retardierung der Entwicklung des Katagens kommt. Bei diesen Tieren war der oben beschriebene Katagen-induzierende Effekt von NGF, NT-3 und BDNF aufgehoben. Bei p75-überexprimierenden Mäusen dagegen zeigte sich eine substantielle Beschleunigung der Ausbildung von Katagen¹³⁶.

Auch bei Schafen wurde ein spezifisches Verteilungsmuster von NGF in den verschiedenen Entwicklungsstadien des Haarzyklus beschrieben, das ein weiteres Indiz für eine physiologische Funktion bei der Regulierung des Haarwachstums bei Säugetieren ist¹³⁷.

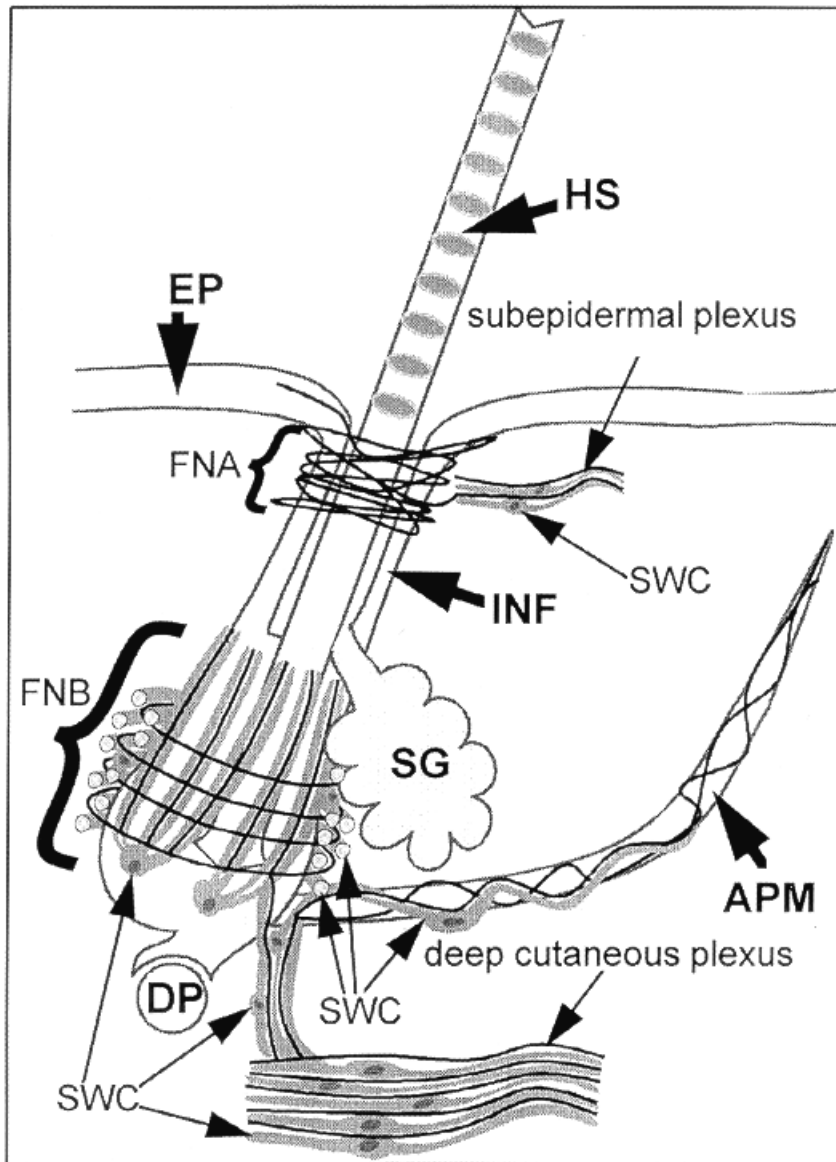


Abbildung 8 : Schematische Darstellung der Innervation des murinen Haarfollikels während des Telogens

Abkürzungen: HS=Haarschaft; FNA und FNB=follicular network A und B; APM=M. arrector pili; DP=dermale Papille; EP=Epidermis; INF=Infundibulum; SG=Talgdrüse; SWC=Schwannzellen

Aus V. Botchkarev et al., 1998, siehe Referenz 131.

2.4 Zytokine

2.4.1 Die Familie der Zytokine

Zytokine sind eine Familie von Proteinen und Polypeptiden, die eine große Anzahl von Zellfunktionen modulieren und dabei in picomolarer oder nanomolarer Konzentration arbeiten^{138,139}. Diese modulierenden Effekte werden durch Bindung an spezifischen Rezeptoren auf der Oberfläche der Zielzellen erreicht^{140,141}.

Wichtige Gruppen sind die Interleukine (IL-1 bis IL-18), die Interferone (IFN- α IFN- β IFN- γ), die koloniestimulierenden Faktoren (M-CSF, G-CSF, GM-CSF), die Tumornekrosefaktoren (TNF- α TNF- β), Wachstumsfaktoren (NGF, EGF) und die Chemokine (RANTES, MCP-1, MIP-1 α), wobei Überlappungen der verschiedenen Gruppen möglich sind (siehe **Tab. 2**)¹⁴².

2.4.2 Funktionen der Zytokine

Die Zytokine sind eigentlich nicht für die normale Zellhomöostase verantwortlich, sondern sie verändern den Metabolismus der Zellen bei Störungen des Wirtsorganismus, wie z.B. bei Entzündungen oder anderen Immunprozessen. Sie nehmen Einfluß auf chemotaktische Vorgänge, Proteinsynthese, Mitogenese und Zelldifferenzierung.

Zytokine sind Mediatoren von parakrinen oder autokrinen Signalen und können darüber hinaus wie Hormone (endokrin) wirken. Zunächst wurde ihre Produktion bei Lymphozyten, Makrophagen und Zellen des Immunsystems im weiteren Sinne beschrieben. Doch auch Zellen, die nicht zum Immunsystem gehören, wie z.B. Epithelzellen und Fibroblasten, produzieren Zytokine¹⁴³.

Bei den Zytokinen handelt es sich überwiegend um Glykoproteine, die auf Zellmembranen oder ungebunden vorkommen. Sie werden aus Vorläuferproteinen durch Proteolyse gebildet¹⁴⁴. Diese Proteine können stimulierende und inhibierende Aktivität an der gleichen Zelle entfalten, je nach Zusammensetzung des äußeren Milieus dieser Zelle. Zytokine können synergistisch oder antagonistisch untereinander wirken¹⁴⁵.

Sie bilden ein Netzwerk, das die Kommunikation zwischen den einzelnen Bestandteilen des Immunsystems, aber auch mit anderen Systemen, wie z.B. Nervensystem und Endokrinium, ermöglicht. Bei der Herausbildung des Immunsystems während der Embryonalperiode sind sie maßgeblich beteiligt^{142,146}.

Tabelle 2: Einteilung der Zytokine nach ihrer Funktion

Abkürzungen: LIF: leukemia inhibitory faktor, TGF: transforming growth factor, GM-CSF: granulocyte macrophage colony stimulating factor, G-CSF: granulocyte colony stimulating factor, MIP: monocyte inflammatory protein, GRO: growth related gene product, RANTES: regulated upon activation, normal T expressed and secreted
Modifiziert nach K.E. Barrett, 1996, siehe Referenz 139.

Entzündlich / Immun	Neoplasie	Wachstum und Differenzierung	Chemokine
IL-1	IL-2	IL-1	IL-8
IL-2	IL-6	IL-3	MIP-1 α
IL-4	IL-9	IL-4	GRO
IL-5	TGF- α , - β	IL-6	RANTES
IL-6		IL-7	
IL-10		IL-9	
IL-12		IL-11	
IL-13		GM-CSF, G-CSF	
LIF		TGF- α , - β	
TNF- α , - β		LIF	
IFN- γ			

2.4.3 Die Rezeptoren der Zytokine

Die Zytokinrezeptoren können in drei Gruppen aufgeteilt werden:

Die größte Gruppe ist die Zytokinrezeptor-Superfamilie, die sich durch eine homologe, aus 200 Aminosäuren bestehende, extrazelluläre Region auszeichnet. Diese Rezeptoren binden Interleukine (IL-2 bis IL-9, IL-12), Wachstumsfaktoren (G-CSF, GM-CSF) sowie Wachstumshormon und Prolaktin.

Eine zweite Gruppe ist Teil der Immunglobulin-Superfamilie und bindet Interferone, IL-1 und M-CSF.

Die dritte Gruppe vermittelt Zelltod und bindet TNF- α und TNF- β , aber auch NGF¹⁴².

Die meisten Zytokinrezeptoren sind Transmembran-Glykoproteine, bei denen oft der eigentliche Rezeptor aus zwei oder mehr Untereinheiten besteht. Häufig bindet ein Zytokin an einer hochspezifischen Untereinheit und gleichzeitig an einer weniger spezifischen, die auch verwandte Zytokine binden kann. Dieses erklärt einerseits ähnliche Wirkmechanismen verwandter Zytokine und andererseits deren spezifische Unterschiede.

Der erste Schritt der Signaltransduktion ist eine ligandeninduzierte Aggregation von Rezeptorkomponenten. Die intrazellulären Bestandteile dieser Komponenten initiieren dann eine Signalkaskade^{147,148}.

Bei vielen dieser Kaskaden spielt neben Phosphorylierung von Tyrosinresten (Tyrosinkinasen) die Aktivierung von sogenannten Janus-Kinasen (Jaks) eine wichtige Rolle. Durch diese Jaks können dann sogenannte stats (signal transducer and activator of transcription) aktiviert werden, welche direkt an der DNA binden und die Gentranskription beeinflussen¹⁴⁹.

Manche Zytokine (TNF- α , IL-1 β) aktivieren die sogenannte MAP-kinase (mitogenaktivierte Proteinkinase), wodurch bestimmte Transkriptionsfaktoren verstärkt an der DNA binden¹⁵⁰.

Die Chemokine besitzen eine eigene Rezeptorfamilie mit sieben transmembranären Glykoproteinen. Bei ihnen kommt es nach Aktivierung von G-Proteinen und Mobilisierung von Second Messenger zur Reorganisation des Zytoskeletts und Bildung fokaler Adhäsionen, die zur gerichteten Bewegung der Zelle führen^{151,152} (siehe **Abb. 9**).

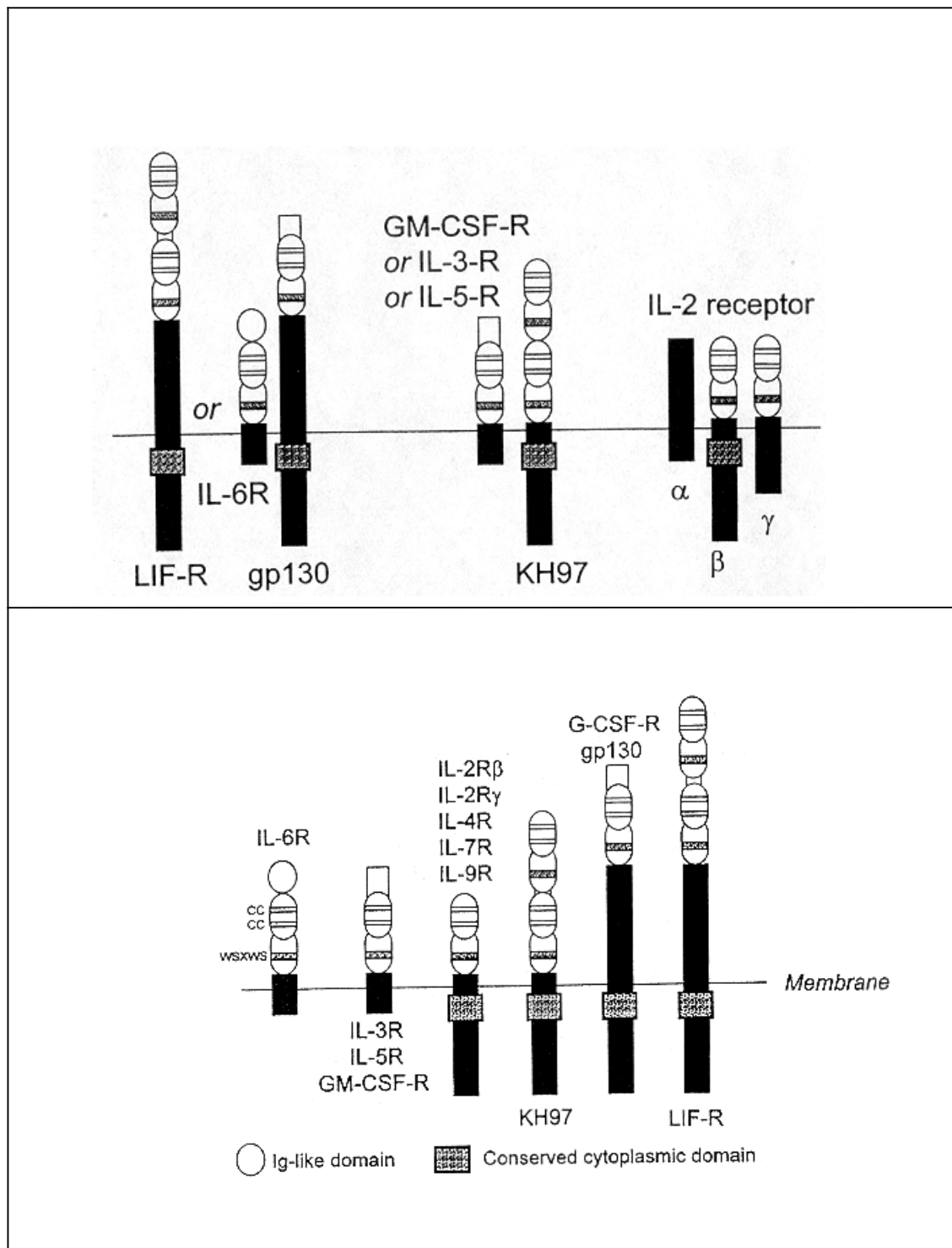


Abbildung 9: Darstellung der verschiedenen Formen der Hämatopoese / Zytokin-Rezeptorfamilie

Oben: Die Zytokinfamilien binden an Polypeptidketten mit bestimmter Struktur

Unten: Substruktur einiger ausgewählter Zytokinrezeptoren

Aus K.E. Barrett, 1996, siehe Referenz 139.

2.4.4 Die Zytokine IL-1 β , IFN- γ und TNF- α

Interleukin-1 (IL-1) wurde zuerst als sogenannter Leukozyten-aktivierender Faktor beschrieben, weil es die Proliferation bestimmter Leukozyten stimuliert. Zusammen mit dem später beschriebenen B-Zellen-stimulierenden Faktor (BAF), der ähnliche biochemische Eigenschaften zeigt, wurde es dann 1979 in IL-1 umbenannt¹⁵³.

Es existieren zwei Formen, IL-1 α und IL-1 β die sich in ihrer Struktur stark unterscheiden, aber biologisch sehr ähnliche Wirkungen haben und an den gleichen Rezeptoren binden^{144,154}. Zwei unterschiedliche Rezeptortypen sind bekannt, wobei IL-1 α eine höhere Affinität für den Typ I und IL-1 β für den Typ II besitzt¹⁵⁵. Beide gehören zur Immunglobulin-Superfamilie.

Interleukin-1 wird von Monozyten und Makrophagen gebildet, aber auch von neutrophilen Granulozyten, Endothelzellen, Fibroblasten, Lymphozyten, Epithelzellen, Gliazellen und Keratinozyten^{144,156,157}.

Die Rezeptoren wurden nachgewiesen auf Lymphozyten, Endothelzellen, Hepatozyten, neutrophilen Granulozyten, Makrophagen, Fibroblasten und ebenfalls auf Keratinozyten^{155,158}. Viele Zellen besitzen beide Rezeptortypen.

Die physiologische Wirkung besteht in der Aktivierung von T-Helfer-Zellen und sukzessiv des gesamten T-Lymphozyten-Systems und der B-Lymphozyten. IL-1 induziert die Produktion von IL-2 und dessen Rezeptor sowie die Expression von Adhäsionsmolekülen, Wachstumsfaktoren und Kollagen. IL-1 bewirkt Fieber und gehört klinisch zu den Akute-Phase-Proteinen^{144,156}.

Es existiert ein natürlicher Antagonist, der von aktivierten Monozyten und Makrophagen produziert wird^{159,160}. Dieser könnte in Zukunft eine interessante Behandlungsmöglichkeit für verschiedene entzündliche Erkrankungen darstellen¹⁶¹.

1975 wurde ein zytotoxischer Faktor beschrieben, der in experimentellen Tumoren eine hämorrhagische Nekrose erzeugen kann. Daher wurde dieser Faktor Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) in Abgrenzung zum aus Lymphozyten gewonnenen Tumornekrosefaktor- β genannt¹⁵³. TNF- α wird von aktivierten Makrophagen und T-Lymphozyten, aber auch von neutrophilen Granulozyten, Astrozyten und einigen Tumorzellreihen produziert¹⁶². Keratinozyten, die durch Endotoxine aktiviert wurden, können ihn freisetzen^{163,164}. Es sind vielfältige Wirkungen des TNF- α beschrieben worden: Apoptose, Degranulation von neutrophilen Granulozyten, die namensgebende Wirkung auf Tumore, Freisetzung von IFN- γ durch T-Lymphozyten, Induktion anderer Zytokine, vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen und viele andere mehr¹⁶³⁻¹⁶⁵.

Interessanterweise scheint TNF- α auch an der Migration von Langerhanszellen in der Haut beteiligt zu sein¹⁶⁶. Es existieren zwei Rezeptortypen, deren Aufgabenverteilung und Zusammenarbeit noch nicht abschließend geklärt sind¹⁶⁷.

Vor mehr als 40 Jahren wurde eine Gruppe löslicher Faktoren entdeckt, die aus virusinfiziertem Gewebe freigesetzt werden und mit nicht infiziertem Gewebe „interferieren“. Daher wurden diese Faktoren Interferone (IFN) genannt¹⁵³. Interferon- γ gehört zu dieser Familie. Interferon- α und - β gehören zu den Typ-I-Interferonen, die hauptsächlich antivirale Eigenschaften besitzen, Interferon- γ dagegen zu den Typ-II-Interferonen, die immunregulatorisch wirken. IFN- α und IFN- β haben einen gemeinsamen Rezeptor, IFN- γ dagegen bindet an einen anderen Rezeptor. IFN- γ wird von T-Lymphozyten und NK-Zellen hergestellt. Im Unterschied zu den Typ-I-Interferonen ist hierfür keine virale Infektion notwendig. Es kann MHC-I- und MHC-II-Komplexe auf der Zelloberfläche induzieren und aktiviert Makrophagen, wirkt aber nicht antiviral. Wie die anderen Interferone aktiviert es verschiedene T-Lymphozyten. Außerdem besitzt es antiproliferative Eigenschaften^{168,169}.

2.4.5 Neurotrophine und Zytokine - eine Verbindung zwischen Nervensystem und Immunsystem

Nervensystem und Immunsystem besitzen zahlreiche Verbindungen und Gemeinsamkeiten. Im Nervensystem tritt eine Anzahl von Krankheiten auf, die durch Immun- bzw. Autoimmunphänomene gekennzeichnet sind (Multiple Sklerose, Myasthenia gravis, Lambert-Eaton-Syndrom). Das Nervensystem wird physiologisch vom Immunsystem beeinflusst (z.B. Schlafinduktion durch IL-1) und vice versa (z.B. Neurodermitis)¹⁵³.

Die meisten lymphoiden Gewebe werden von sympathischen Nervenfasern versorgt, und die Produktion sowie Freisetzung immunmodulierender Substanzen wie z.B. Corticosteroide, Wachstums- und Schilddrüsenhormone und Adrenalin werden vom Nervensystem über die Hypothalamus-Hypophysen-Achse gesteuert. Die Zytokine IL-1 und IL-6 stimulieren die Freisetzung von CRH (corticotrophin-releasing hormone) im Hypothalamus und werden von verschiedenen Nerven- und Gliazellen hergestellt¹⁴².

Wie dokumentiert sich nun das Zusammenspiel von Nervensystem und Immunsystem auf Basis der Zytokine und Neurotrophine?

Für IL-1 β , TNF- α , IFN- γ und andere Entzündungsmediatoren wurde ein stimulierender Einfluß auf die Neurotrophinproduktion in Neuronen und Gliazellen^{18,170-175}, aber auch in nicht-neuronalen Geweben wie Synovia¹⁷⁶, Fibroblasten¹⁴⁻¹⁶ und Mesangiumzellen¹⁷ nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, daß in der Haut gerade das Zusammenspiel von Zytokinen und Neurotrophinen einen wichtigen pathophysiologischen Aspekt bei der Entstehung einer Hyperalgesie bei Entzündungen darstellt¹⁷⁶⁻¹⁷⁹.

Auch umgekehrt kann die Zytokinproduktion durch Neurotrophine positiv beeinflusst werden¹⁸⁰. Diese Interaktionen sind wichtig bei Heilungsprozessen im Nervensystem, wie es für das Zusammenspiel von TNF- α , IL-1 β und IL-6 mit NGF, BDNF, NT-3, p75 NTR und Trk-B gezeigt werden konnte. Ob dies zu den physiologischen Reparaturmechanismen beiträgt oder ein Ausdruck neuronaler Degenerationsprozesse ist, bleibt noch unklar^{181,182}.

Als weiteres Beispiel für die Interaktion von Immunsystem und Nervensystem über die Neurotrophine sei genannt, daß NGF und BDNF maßgeblich bei der Entstehung der Atemwegshyperreagibilität beim allergischen Asthma bronchiale beteiligt sind¹⁸³.

2.4.6 Zytokine und Haarwuchsmodulierung

Viele haarwuchsmodulierende Substanzen sind zusätzlich potente Immunmodulatoren, und manche Alopezien haben eine Immunpathogenese. Auf die Bedeutung immunologischer Vorgänge bei der Kontrolle des Haarwachstums weist auch hin, daß viele Autoimmunerkrankungen mit Haarausfall assoziiert sein können^{49,184}.

Für die betrachteten Zytokine sind einige haarwuchsmodulierende Eigenschaften bekannt. In menschlichen Haarfollikeln konnte die Produktion von IL-1 β und TNF- α nachgewiesen werden¹⁸⁵. In einem Mausmodell einer entzündlichen Hauterkrankung mit Haarausfall wurden erhöhte IL-1 α Spiegel in der Epidermis nachgewiesen¹⁸⁶. Bei Patienten mit Alopecia areata konnte ein erhöhter Genpolymorphismus für IL-1 gezeigt werden, außerdem war ein bestimmtes Allel für TNF- α verringert¹⁸⁷.

TNF- α und IL-1 β hemmen das Wachstum von Organkulturen menschlicher Haare^{11,9} und in Alopecia-areata-Läsionen konnte ein erhöhter Gehalt von IL-1 β sowie anderer Zytokine, wie z.B. IFN- γ gefunden werden^{10,11}. Während des Katagenstadiums sind in Maushaut IL-1 α und IL-1 β sowie IL-1 Rezeptor mRNA stark erhöht nachweisbar¹².

Kürzlich konnte nachgewiesen werden, daß in Keratinozyten der Haarfollikel von C57BL/6-Mäusen durch subkutane Injektion von TNF- α oder IL-1 β Apoptose ausgelöst werden kann.

Durch Gabe eines Cocktails aus TNF- α , IL-1 β und IFN- γ konnte dieser Effekt noch einmal deutlich verstärkt werden. Auch in Keratinozyten der Epidermis konnten TNF- α und der Zytokincocktail die Zahl der apoptotischen Zellen signifikant erhöhen¹⁸⁸.

Somit spielen diese Zytokine eine beträchtliche Rolle in der Regulation des Haarzyklus, wahrscheinlich unter anderem durch Auslösung eines programmierten Zelltodes bestimmter Keratinozytenpopulationen und sind an der Entstehung von Erkrankungen des Haarkleides beteiligt.

2.5 Cyclosporin A und Dexamethason - Immunmodulatoren mit Wirkung auf Zytokine und Haarwuchs

Cyclosporin A (CsA) ist ein von dem Pilz *Tolypocladium inflatum* gebildetes Peptid, das v.a. über die Hemmung der IL-2 Produktion die Aktivierung von T-Lymphozyten unterbinden kann¹⁵³. Es bindet an zytoplasmatische Proteine (Immunophilinen), über die es seine hemmende Wirkung auf die Transkription von Genen für Zytokine und T-Zell-Proliferation entfaltet¹⁴². Als hochpotentes immunsuppressives Medikament, das sehr große Bedeutung in der Transplantationsmedizin besitzt, hat es zahlreiche Nebenwirkungen, deren interessanteste in diesem Zusammenhang die Induktion von Haarwuchs ist. Dieser vermehrte Haarwuchs tritt sowohl nach topischer als auch nach systemischer Gabe auf³⁰.

Die Produktion von IL-1 β , TNF- α und IFN- γ sowie anderer Zytokine wird von CsA in verschiedenen Zellen und Geweben, darunter auch Keratinozyten, inhibiert^{27,28,189-191}.

Die Wirkung des CsA auf den Haarwuchs ist gut dokumentiert. Es konnte bei Mäusen gezeigt werden, daß es nicht nur Anagen auslöst, sondern auch eine durch Dexamethason induzierte Katageneinleitung verhindert und vor einer durch Cyclophosphamid ausgelösten Follikeldystrophie mit konsekutiver Alopezie schützen kann^{29,31-33}.

Dexamethason gehört zur Gruppe der synthetischen Glucocorticoide und leitet sich damit strukturell vom Nebennierenrindenhormon Cortisol her. Alle Glucocorticoide wirken über einen spezifischen zytoplasmatischen Rezeptor, der die Transkriptionsrate einer Reihe von Proteinen verändert. Welche Wirkungen konkret ausgelöst werden, hängt von der Zielzelle ab¹⁵³. Die Produktion zahlreicher Zytokine wird durch Dexamethason gehemmt, darunter auch die von IL-1 β , TNF- α und IFN- γ ^{25,26,142}.

Klinisch werden die Glucocorticoide wegen ihrer immunsuppressiven und antiphlogistischen Eigenschaften verwendet. Somit können sie zur Behandlung von Erkrankungen mit Haarausfall, bei denen eine Entzündung vorliegt, wie beispielsweise Alopecia areata, therapeutisch genutzt werden¹⁹².

Allerdings ist diese Anwendung insofern theoretisch begrenzt, als daß Glucocorticoide nicht nur immunsuppressiv wirken, sondern auch einen direkten Einfluß auf den Haarwuchs entfalten. Für Glucocorticoide im Allgemeinen und für Dexamethason im Speziellen ist die Induktion von Katagen nach topischer und systemischer Gabe bei Mäusen und Ratten gut nachgewiesen^{32,33,193}. Beim Menschen dagegen können Glucocorticoide interessanterweise auch zu einer Hypertrichose führen⁴⁶.

Wichtig ist in diesem Zusammenhang, daß durch Glucocorticoide bzw. Dexamethason auch der Neurotrophinhaushalt beeinflußt wird. Vor allem in hippocampalen Neuronen bzw. Gliazellen konnte eine stimulierende Wirkung auf die Produktion von NGF und NT-3 nachgewiesen werden^{34,35,194}, wogegen die aktivitätsabhängige BDNF-Freisetzung im Hippocampus inhibiert wird³⁶.

2.6 Das C57BL/6-Mausmodell

Die Maus hat als *In-vivo*-Modell weite Verbreitung in der Erforschung haarbiologischer Grundlagenprobleme gefunden. An ihr konnten modellhaft Erkenntnisse gewonnen werden, die für das Verständnis der Haarbiologie von herausragender Bedeutung sind^{42,43,45}.

Auch über die Natur der Neurotrophine konnte vieles mit Hilfe von Mäusen erforscht werden. Für die Versuche, bei denen Mutanten mit Knockout-Genen für bestimmte Neurotrophine oder deren Rezeptoren erzeugt wurden, verwendete man überwiegend Mäuse⁶⁵. Auch für die Entdeckung wichtiger Funktionen der Neurotrophine außerhalb des Nervensystems spielten Mäuse als Versuchstiere eine wichtige Rolle¹⁰⁷⁻¹⁰⁹.

Da das Immunsystem der Maus ebenfalls umfassend untersucht wurde, ist für die Zielsetzung dieser Arbeit ein Mausmodell besonders geeignet. Beispielsweise wurde als Modell für die Interaktion von Immunsystem und Zytokinen mit Neurotrophinen an einem Mausmodell die Rolle von NGF bei der Herausbildung der Atemwegshyperreagibilität bei Asthma bronchiale untersucht¹⁹⁵.

Schließlich wurden die Erkenntnisse über die haarwuchsmodulierenden Eigenschaften von Neurotrophinen fast ausschließlich an Mäusen gewonnen, wobei auch auf verschiedene Mausstämme von Neurotrophin-überexprimierenden oder Knockout-Tieren zurückgegriffen werden konnte^{3-8,136,196}.

Die C57BL/6-Maus bietet sich für Haarforschungszwecke an, da ihr Haarwachstumsverhalten sehr gut bekannt ist und mit dem depilationsinduzierten Haarzyklus ein hervorragendes Modell für die experimentelle Untersuchung von Haarwachstum zur Verfügung steht^{43,45-47}. Während beim Menschen ein mosaikartiges Verteilungsmuster asynchroner Haarfollikelaktivität zu finden ist, läuft das Haarwachstum bei der Maus synchronisiert und in Wellen über den Körper fortschreitend ab⁴⁴. Die normale Länge des murinen Haarzyklus beträgt ca. 17 bis 20 Tage, ist damit von relativ kurzer Dauer und verläuft unabhängig von den Jahreszeiten⁴³. Mittels einer Mischung aus Harz und Wachs kann durch die Depilation telogener Haarschäfte im depilierten Areal ein neuer Haarzyklus induziert werden, der dem spontanen Haarwachstum morphologisch vergleichbar ist^{29,197}. Somit bietet sich die Möglichkeit, in adulten Mäusen zyklussynchronisierte Haarfollikel in definierten Abschnitten des Haarzyklus innerhalb ihrer physiologischen Umgebung zu studieren.

Schließlich besitzt die C57BL/6-Maus den Vorteil, daß die intradermale Melanogenese nur während des Anagens stattfindet und auch dabei nur nahe der Haarfollikel¹⁹⁸. Daher läßt sich schon makroskopisch anhand der Farbe der Haut zuverlässig feststellen, in welcher Phase des Haarzyklus sich die Follikel gerade befinden.

2.7 Herleiten der Fragestellung

Zusammenfassend läßt sich also feststellen, daß zwischen den untersuchten Stoffgruppen vielfältige Zusammenhänge existieren (siehe **Abb. 10**). Sowohl die untersuchten Zytokine IL-1 β , TNF- α und IFN- γ als auch die Neurotrophine NGF, BDNF, NT-4 und NT-3 wirken modulierend auf den Zyklus der Haarfollikel. Zwischen den Zytokinen und Neurotrophinen sind wiederum zahlreiche Wechselwirkungen bekannt. So ergibt sich die Frage, ob es diese Interaktionen auch in der Haut bzw. speziell im Haarfollikel gibt. Durch immunhistologische Untersuchungen sollte festgestellt werden, ob nach intradermaler Behandlung von Mäusen mit Zytokinen das Neurotrophinmuster verändert ist. Es stellte sich die Frage, ob auch hier die Zytokine stimulierend auf die Neurotrophinproduktion wirken, wie es in einigen anderen Geweben gezeigt werden konnte.

Cyclosporin A wurde ebenfalls betrachtet, da es als potentes Immunsuppressivum zahlreiche Zytokine herunterreguliert und ein potentes Haarwuchsmittel ist. Dexamethason wiederum inhibiert das Haarwachstum, kann wie Cyclosporin A verschiedene Zytokine herunterregulieren, wirkt jedoch zumindest im Nervensystem auch direkt auf den Neurotrophinhaushalt. Diese beiden Substanzen können also zum Vergleich herangezogen werden, weil sie auf verschiedenen Ebenen des betrachteten Systems regulierend eingreifen.

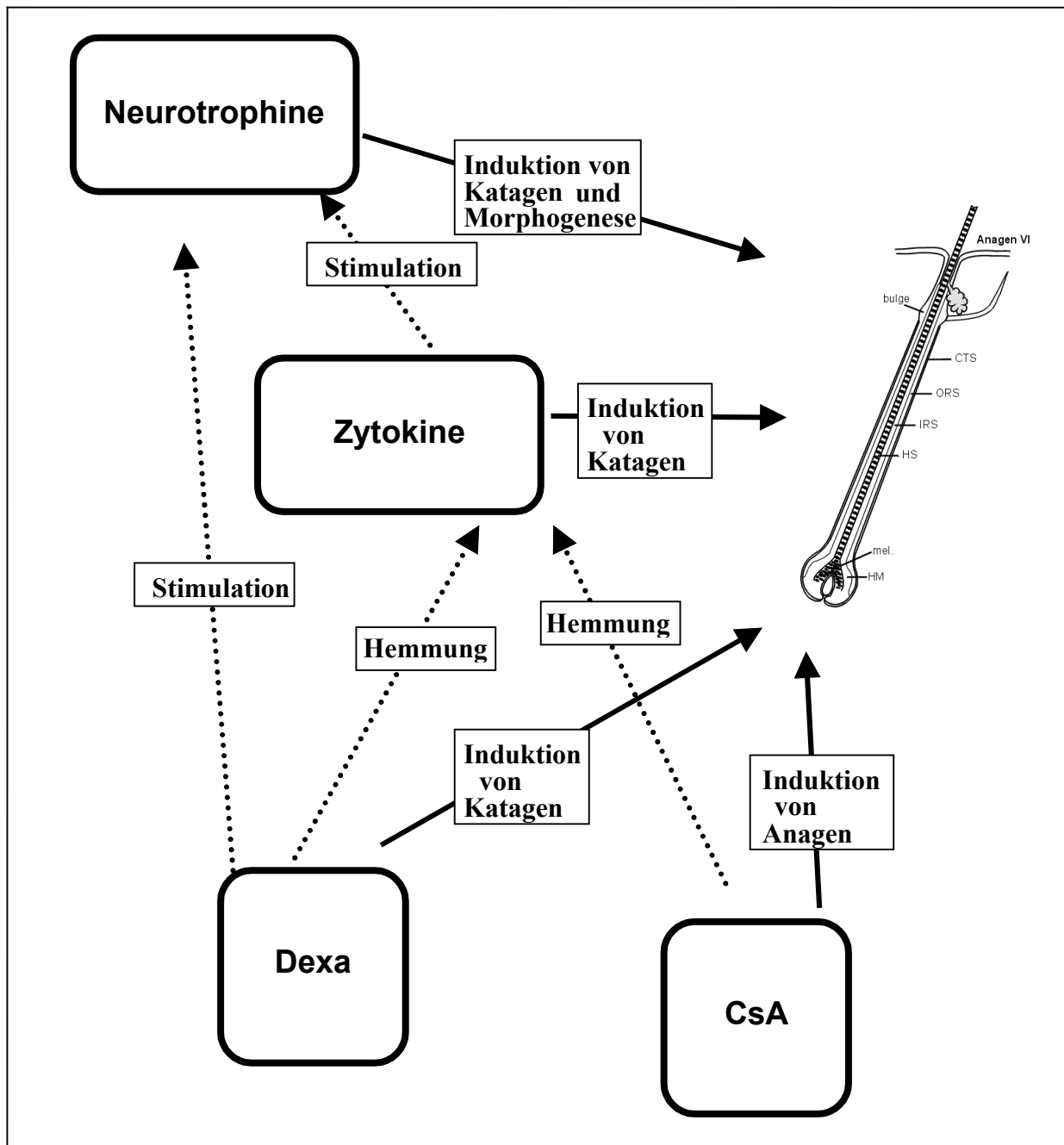


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Interaktionen zwischen den betrachteten Systemen

Alle betrachteten Stoffgruppen modulieren den Haarzyklus, CsA und Dexa hemmen die Produktion von Zytokinen, Zytokine und Dexa stimulieren die Produktion von Neurotrophinen.
Abkürzungen: CsA=Cyclosporin A, Dexa=Dexamethason

2.8 Zielsetzung

Für die Entwicklung neuer Hypothesen über das Zusammenspiel von Neurotrophinen und Zytokinen bei der Modulation des Haarzyklus sollen am Mausmodell folgende spezifische Fragen beantwortet werden:

- A) Können die Zytokine IL-1 β , TNF- α und IFN- γ die *In-vivo*-Expression der Neurotrophine NGF, BDNF, NT-4 und NT-3 sowie ihrer Rezeptoren Trk-A, Trk-B und Trk-C bzw. p75 NTR in murinen Anagen-Haarfollikeln verändern?
- B) Gibt es auch einen Einfluß auf die Neurotrophin-Expression durch das immunsuppressive Medikament CsA?
- C) Wie wirkt in diesem Zusammenhang Dexamethason, das den Haarzyklus sowie die Zytokin- und Neurotrophin-Expression beeinflusst?

2.9 Untersuchungsstrategie

Für die Untersuchung dieser Fragestellungen wurde das C57BL/6-Mausmodell mit einem depilationsinduzierten Haarzyklus verwendet. Neurotrophine, Zytokine und Haarwachstum sowie das Immunsystem sind an der Maus gut untersucht.

Um den Zusammenhang von Zytokinen und Neurotrophinen in der Biologie des murinen Haarzyklus zu studieren, wurden die Mäuse während des Anagens mit intradermalen Injektionen von TNF- α , IFN- γ und IL-1 β behandelt. Von den behandelten Mäusen wurden dann Hautstücke entnommen und nach einer speziellen Methode zur Erhaltung longitudinaler Schnitte weiterverarbeitet¹⁹⁹.

Schließlich wurden die Präparate für die Neurotrophine NGF, NT-3, NT-4 und BDNF sowie ihre Rezeptoren Trk-A, Trk-B, Trk-C und p75 NTR gefärbt, wobei auf die umfangreichen Arbeiten und Färbeprotokolle von Vladimir A. Botchkarev und Natalia V. Botchkareva zurückgegriffen

werden konnte. Dabei wurden für p75 NTR die ABC-Färbung und für alle anderen Neurotrophine und Rezeptoren die indirekte Immunfluoreszenz als Methode verwendet.

Als Vergleichssubstanzen wurden Cyclosporin A (intraperitoneal) und Dexamethason (topisch) ebenfalls verabreicht. Die Weiterverarbeitung der Haut und die Anfertigung der Präparate erfolgten dann nach den gleichen Methoden wie bei den Zytokinen.

Die Präparate wurden schließlich fluoreszenz- bzw. lichtmikroskopisch untersucht und mit den Präparaten der Kontrolltiere verglichen, wobei sich semiquantitative Änderungen der Verteilungsmuster ergaben. Wenn sich die Änderung der Immunreaktivität auf einzelne Zellen beschränkte, wurde eine histomorphometrische Untersuchung durchgeführt.

3 Material und Methoden

3.1 Tiermodell

3.1.1 Die C57BL/6-Maus

Die C57BL/6-Maus wurde verwendet, da sie aufgrund ihrer charakteristischen Eigenschaften gut für die Haarforschung geeignet ist (siehe 2.6). Wichtig ist vor allem die schwarze Farbe ihres Fells, wodurch in Zusammenhang mit Veränderungen der Hautpigmentierung auch der Wechsel des Haarzyklus makroskopisch sichtbar wird^{43,198}. Ihr Haarzyklus ist gut untersucht, und es wurden zahlreiche Erkenntnisse modellhaft an ihr gewonnen. Schon in sehr frühen, wegweisenden Studien über die Natur des Haarzyklus wurden C57BL/6-Mäuse verwendet^{43,45}.

Die daraus gewonnenen Erkenntnisse spielen für die Beurteilung des humanen Haarzyklus eine große Rolle, obwohl natürlich nicht alle gewonnenen Erkenntnisse auf den Menschen übertragen werden können. So ist z.B. für Corticosteroide bei Mäusen und Ratten eine Katageninduktion gut nachgewiesen^{32,33}, dagegen können Corticosteroide beim Menschen zur Hypertrichose führen⁴⁶. Für die spezielle Fragestellung dieser Arbeit ist die C57BL/6-Maus sehr gut geeignet, weil schon Vorarbeiten, die den Einfluß der Zytokine und der Neurotrophine auf den murinen Haarzyklus untersuchten, an diesem Tiermodell durchgeführt wurden^{3-8,136,188,196}.

Wie in Kapitel 2.6 dargelegt, handelt es sich bei den C57BL/6-Tieren um ein gut etabliertes Modell, an dem beispielhaft Wachstums- und Regressionsprozesse am Haarfollikel untersucht werden können. Dabei kann der Haarfollikel als ein Modell für ein zyklisch aktives Organ verstanden werden, an dessen Beispiel grundlegende biologische Zusammenhänge im Makro- und Mikrobereich betrachtet werden können⁵⁰.

3.1.2 Haltung der Tiere

Sechs bis neun Wochen alte, syngenetische C57BL/6-Mäuse wurden von Charles River (Sulzfeld) bezogen. Die Mäuse wurden zu 10-12 Tieren in Gemeinschaftskäfigen (Polycarbonatkäfig; Typ III, UNO, Niederlande) im Forschungshaus der Charité Berlin, Campus Virchow Klinikum, unter konventionellen Standardbedingungen ($21 \pm 1^\circ\text{C}$, $55 \pm 5\%$ Luftfeuchtigkeit, 10 Wechsel frischer gefilterter Luft pro Stunde) gehalten. Dabei waren sie

einem 12-Stunden-Lichtrhythmus ausgesetzt (150 Lux/ Dunkelperiode) und bekamen sowohl Futter als auch Wasser *ad libitum*.

Nur Mäuse, deren Haarzyklus sich im Telogen befand, wurden für die Untersuchung benutzt. Hier kann am besten durch Depilierung der Rückenhaut ein Areal mit vollständig synchronisierten Haarfollikeln erzeugt werden, bei dem sich zu einem definierten Zeitpunkt alle Follikel im Anagen-VI-Stadium befinden. Die Tiere hatten vorher einen vollständigen postnatalen Haarzyklus durchlaufen. Da es bei diesen Mäusen wie erwähnt nur während des Anagens zur Melaninproduktion in der Haut kommt, können die Tiere, deren Follikel sich im Telogen befinden, zuverlässig an der rosafarbenen Erscheinung der Rückenhaut erkannt werden. Der Versuchsbeginn erfolgte dann in der Regel innerhalb von zwei Wochen, frühestens jedoch drei Tage nach Lieferung der Mäuse.

3.1.3 Induktion von Anagen durch Depilation

Unter Generalanästhesie mit Ketaminhydrochlorid (intraperitoneale Injektion von 0,5 ml einer 10%-igen Ketanest® -Lösung nach vorheriger Äther-Inhalationsnarkose) wurde die Rückenhaut der Tiere mit Hilfe einer Mixtur aus geschmolzenem Bienenwachs und Harz vollständig depiliert. Die beiden Stoffe wurden zu gleichen Gewichtsanteilen gemischt und durch Erhitzen auf etwa 45 °C geschmolzen. Mit einem erwärmten Metallspatel erfolgte ein gleichmäßig dünner, großflächiger Auftrag der flüssigen Masse auf die Rückenhaut der anästhesierten Tiere. Hierbei wurde besonders darauf geachtet, auf der empfindlichen Haut der Nacken- und Schwanzregion keine Verbrennungen zu setzen. Nach ungefähr zwei Minuten wurde die dann erkaltete, gehärtete Wachs-Harz-Mischung mit den darin festhaftenden Haarschäften manuell entfernt^{46,47,197}.

Dieser Vorgang stellt einen starken Wachstumsreiz für die Haarfollikel dar, und es kommt im depilierten Areal zur Transformation der Telogen-Follikel in Anagen-Follikel mit entsprechend erhöhter Melaninproduktion. Dieses führt innerhalb von 5-6 Tagen zur verstärkten Pigmentierung und Verdickung der Haut. Nach 8-9 Tagen sind reife Anagen-VI-Follikel entwickelt, und die Hautfarbe wechselt von rosa zu grau bis schwarz. Nach 10-11 Tagen schließlich sind gleichförmige schwarze Haare zu sehen.

Mit dieser Methode ist es möglich, ein Hautareal zu erzeugen, in dem sich alle Haarfollikel aufgrund der hochgradigen Synchronisation des Haarzyklus im gleichen Stadium befinden, wodurch eine bessere Vergleichbarkeit der verschiedenen Follikel gegeben ist. Es kommt bei

korrekt durchgeführter Depilation zu keiner sichtbaren Entzündungsreaktion. Histologisch, funktionell und makroskopisch sind die durch Depilation erzeugten Follikel nicht von den sich spontan entwickelnden Anagen-VI-Follikeln zu unterscheiden⁴⁶.

Nach 17-20 Tagen schließlich treten die Haarfollikel spontan in das Katagen ein, was sich durch die Änderung der Hautfarbe von schwarz zu rosa dokumentiert. Dabei ist noch kein sichtbarer Haarausfall zu verzeichnen.

Materialien, Reagenzien, Geräte
<ul style="list-style-type: none">• Äther, Hoechst AG, Frankfurt• 10 %-ige Ketaminhydrochlorid Lösung; Ketanest[®], Parke-Davis, Berlin• Bienenwachs; Aldrich Chemical Comp. Inc., Milwaukee, USA• Harz; Sigma Chemie, Deisenhofen• Metallspatel; Carl Roth GmbH&Co., Karlsruhe• klinikübliche Einmalinjektionsspritzen, 1 ml; Einmalkanülen 25Gx1"

3.2 Zytokinapplikation

Die Zytokine wurden mittels intradermaler Injektion in die Rückenhaut appliziert. Die Injektionen erfolgten zwei mal innerhalb von vier Stunden am Tag 12 nach der Depilation (siehe **Abb. 11**). Dabei wurden verwendet: TNF- α (10 μ g: R&D Systems, Minneapolis, MN; 410-MT010), IFN- γ (10.000 Units: Sigma Chemical, St. Louis, MO; I5517), Il-1 β (500ng: R&D Systems, Minneapolis, MN ; 401-ML-005) und ein Cocktail mit gleichen Anteilen aller 3 Zytokine.

Die Zytokine wurden vor der Injektion in 100 μ l PBS, welches 0,1 % BSA enthielt, gelöst.

Die Kontrolltiere erhielten bei sonst gleichen Bedingungen Injektionen mit lediglich 100 μ l PBS und 0,1 % BSA ohne Zytokinzugabe.

Am Tag 13 post depilationem (p.d.) wurde die Haut geerntet und weiterverarbeitet (s.u.).

Die hier verwendeten Zytokinkonzentrationen sind in der Lage, aktives Haarwachstum zu inhibieren¹¹. Auch für die immunologische Beeinflussung und die Auslösung eines programmierten Zelltodes wurden derartige Konzentrationen für die intradermale Injektion verwendet^{188,200}. Diese Konzentrationen wurden gewählt, weil ein hypothetischer Zusammenhang mit der Neurotrophin-Expression im Haarfollikel so am besten gezeigt werden kann.

Materialien, Reagenzien, Geräte		
Zytokin	Hersteller	Bestellnummer
TNF- α	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA	410-MT010
IFN- γ	Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA	I5517
Il-1 β	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA	401-ML-005
klinikübliche Einmalinjektionsspritzen, 1 ml; Einmalkanülen 25Gx1"		

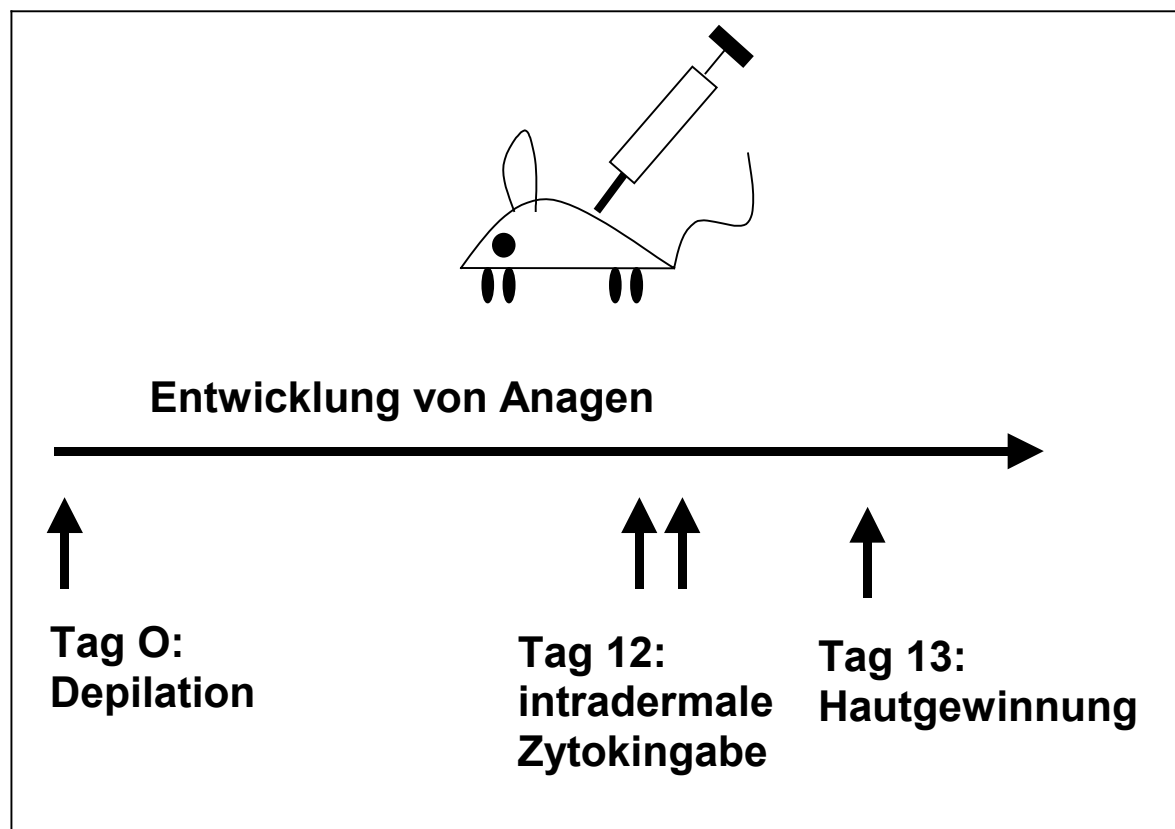


Abbildung 11: Applikation der Zytokine

Nach Depilation der Rückenhaut am Tag 0 wurde am Tag 12 zweimalig das jeweilige Zytokin bzw. der Cocktail intradermal appliziert und am Tag 13 die Haut geerntet.

3.3 Systemische CsA-Behandlung

Da die Behandlung mit CsA das Anagenstadium induziert, wurde in dieser Gruppe keine Depilation durchgeführt. 250 mg/kg CsA (SANDIMMUN[®], Sandoz Pharma Ltd., Basel, Schweiz) in 0,5 ml Maisöl wurden am Tag 0, 1 und 3 bei Telogen-Mäusen intraperitoneal injiziert (siehe **Abb. 12**). Kontrolltiere erhielten lediglich Injektionen von Maisöl bei sonst identischen Bedingungen. Unter dieser Behandlung konnte in früheren Versuchen wiederholt eine Induktion von Anagen beobachtet werden, die bei den Kontrollmäusen nicht oder nur in wesentlich geringerem Umfang nachweisbar war^{29,33}. Bei diesen Versuchen zeigte sich bereits am Tag 9 durch eine Dunkelfärbung der Haut bei ca. einem Drittel der Tiere die Entwicklung von Anagen, am Tag 12 zeigte sie sich schließlich bei ca. 80 %, wogegen bei den Kontrolltieren zum gleichen Zeitpunkt nur bei ca. einem Viertel die Entwicklung von Anagen zu verzeichnen war. Am Tag 15 nach erstmaliger CsA-Applikation wurde die Haut geerntet und weiterverarbeitet (s.u.). Somit konnte durch die hier beschriebene Behandlung eine Induktion von synchronisierten Anagen-VI-Follikeln erreicht werden. Daher ergab sich eine Vergleichbarkeit mit den Haarfollikeln der Kontrollgruppe, die sich ebenfalls im Anagen VI befanden. Gleichzeitig unterschieden sich die Versuchstiere von der Kontrollgruppe dadurch, daß bei ihnen eine nachweislich effektive haarwuchsmodulierende Behandlung durchgeführt worden war, wobei zusätzlich eine Veränderung des Zytokinmilieus anzunehmen ist, da alle 3 betrachteten Zytokine von CsA herunterreguliert werden^{27,28,189-191}.

Materialien, Reagenzien, Geräte		
	Hersteller	Handelsname
Cyclosporin A	Sandoz Pharma Ltd., Basel, Schweiz	SANDIMMUN [®]
klinikübliche Einmalinjektionsspritzen, 1 ml; Einmalkanülen 25Gx1"		

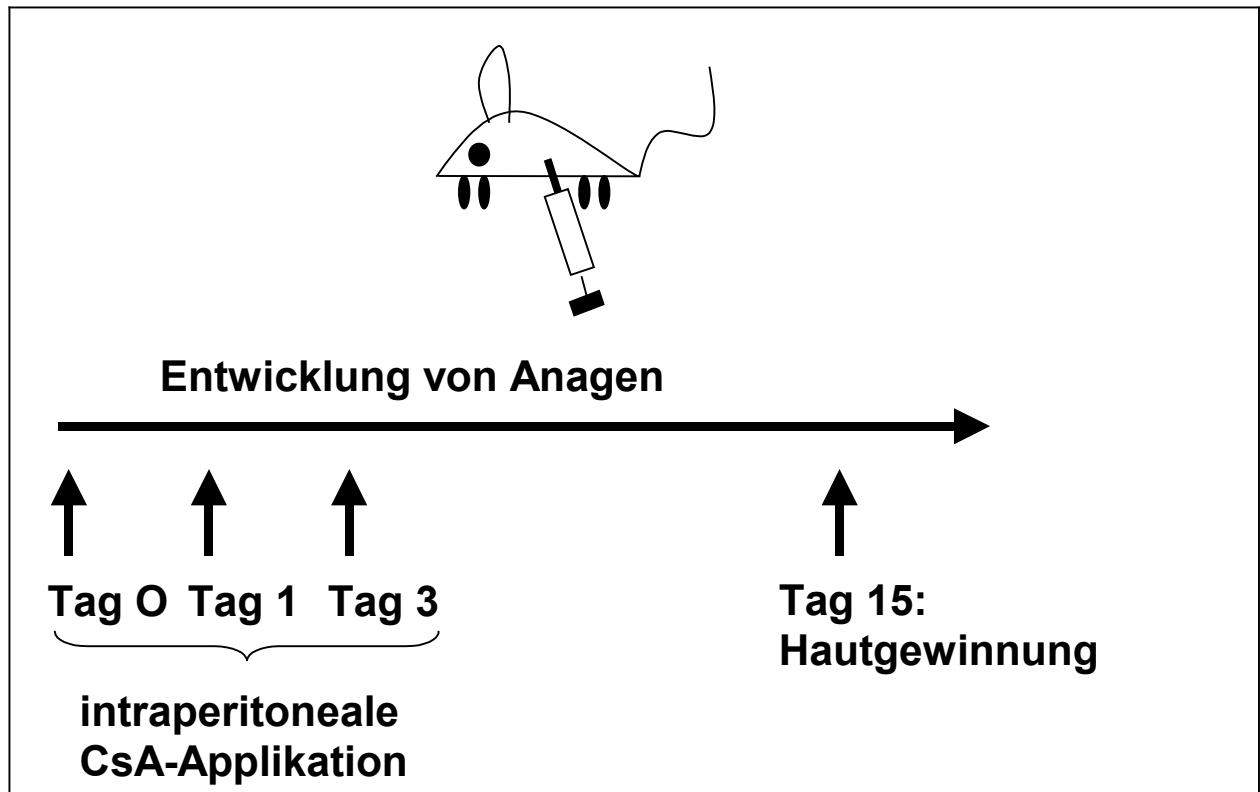


Abbildung 12: Applikation von CsA

Mittels intraperitonealer CsA-Gabe an den Tagen 0, 1 und 3 wurde Anagen induziert und die Haut am Tag 15 geerntet.

3.4 Topische Dexamethason-Gabe

Am Tag 9 nach der Depilation, nachdem alle Haarfollikel der Rückenhaut in das Anagen VI eingetreten waren (s.o.), wurde mit der topischen Dexamethason-Gabe begonnen, die bis zum Tag 13 einmal täglich fortgeführt wurde (siehe **Abb. 13**). Dexamethason (0,1% in Propylenglykol: Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) wurde mit Hilfe eines Pinsels auf die Rückenhaut aufgetragen, die Kontrolltiere erhielten entsprechend lediglich Propylenglykol. Es konnte schon in früheren Arbeiten gezeigt werden, daß es bei dieser Behandlung zu einer signifikanten Verkürzung des Anagens kommt, was sich in einer im Vergleich zu den Kontrolltieren früher auftretenden Entfärbung der Haut zeigte. Histologisch sieht man ein normales Katagen, das von spontan aufgetretenem Katagen nicht zu unterscheiden ist, aber verfrüht auftritt^{32,33}.

Die Haut wurde am Tag 15 p.d. geerntet und weiterverarbeitet.

Materialien, Reagenzien, Geräte	
	Hersteller
Dexamethason	Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA
Handelsüblicher Pinsel	

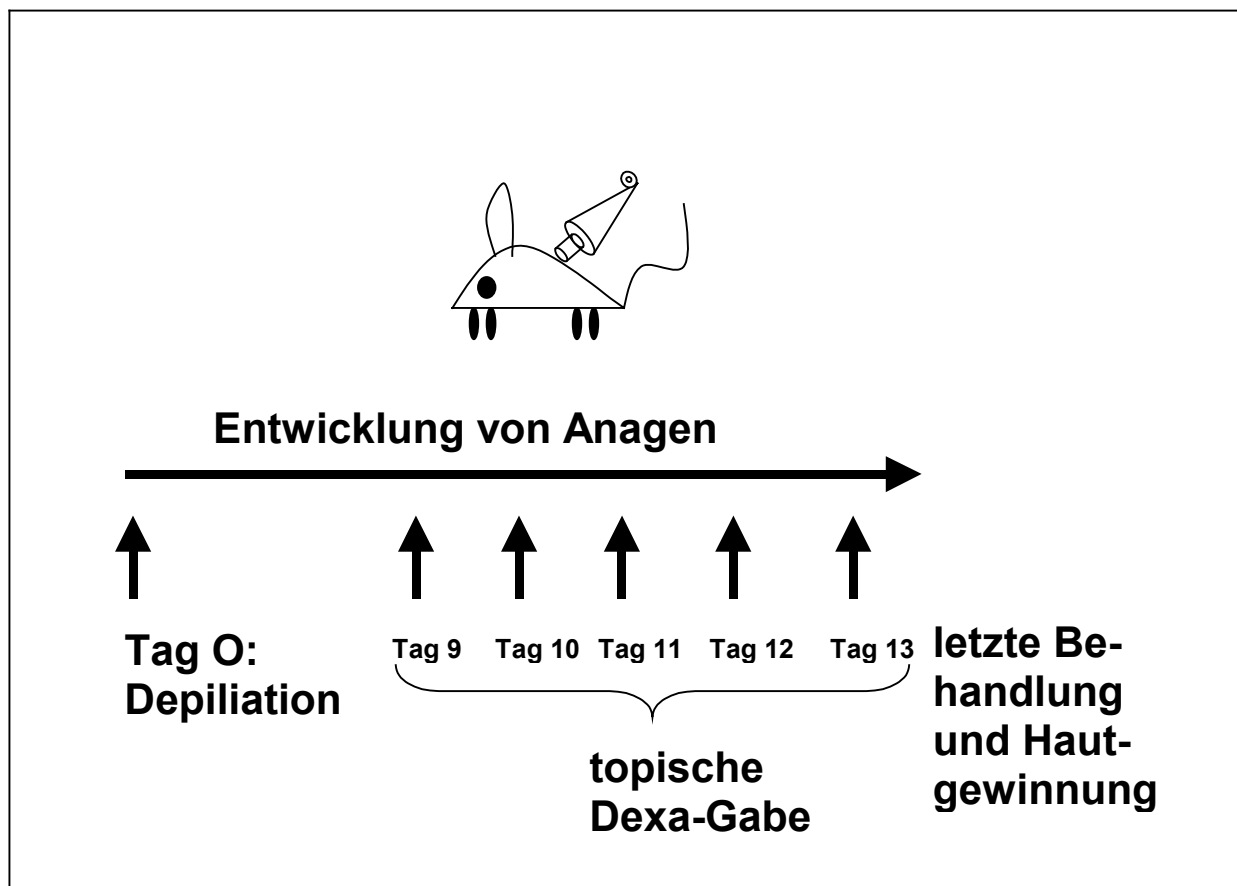


Abbildung 13: Applikation von Dexamethason

Nach Depilation der Rückenhaut am Tag 0 wurde Dexamethason von Tag 9 bis Tag 13 jeweils einmal mit Hilfe eines Pinsels auf die Haut aufgetragen. Die Hauternte erfolgte am Tag 13 nach der letzten Behandlung.

3.5 Verarbeitung der Haut

3.5.1 Hautentnahme

Zum angegebenen Zeitpunkt wurden die Tiere mittels zervikaler Dislokation nach einer Äther-Inhalationsanästhesie getötet. Mit einem Kleintierscherapparat erfolgte eine Rasur des Rückens, sofern bereits Haarschäfte nachgewachsen waren. In Höhe des Schwanzansatzes wurde die Haut mit einem Skalpell perforiert und dann mit einer Präparierschere zunächst großflächig stumpf von der darunter liegenden Körperfaszie abgetrennt. Die so mobilisierte Rückenhaut konnte durch scharfen Scherenschnitt von der Maus abgetrennt werden.

Die Haut wurde zur weiteren Verarbeitung auf ein mit Haushaltsaluminiumfolie beklebtes Stück dünnen Kartons aufgespannt. Aus diesem großen Hautstück wurde mit einem Skalpell in exakt paralleler Orientierung zur Körperlängsachse in der Vertebrallinie und etwa 1 cm kranial des Schwanzansatzes ein ca. 0,5cm × 1cm kleines Hautstück mitsamt daranheftendem Karton herausgeschnitten. Im nächsten Arbeitsschritt wurde die Probe dünn mit kryohistologisch tauglichem Einbettmedium (Jung, Leica Instruments GmbH, Nussloch) bestrichen, die kraniale Hälfte vorsichtig am äußersten Rand des Gewebes mit einer feinen, anatomischen Pinzette gefaßt, von der Alufolie gelöst und deckend auf die kaudale Hälfte des Hautstücks umgeschlagen. Durch die klebrige Eigenschaft des Einbettmediums und die auf dem unteren Teil des Kartons noch haftende Hälfte des Hautstreifchens konnte den Aufroll- und Schrumpfungstendenzen der Maushaut entgegengewirkt werden. Das erhaltene flache Hautstück war auf diese Weise während des folgenden ersten Gefrierschritts in flüssigem Stickstoff immer noch plan, d.h. ohne Verdrehung, aufgespannt. Nach rascher Entfernung von Karton und Pappe hatte man dann eine gefrorene, in sich stabile Hautprobe mit gleichzeitig definierten Orientierungsverhältnissen der Haarfollikel. In den weiteren Einbettschritten war damit eine Handhabung und Ausrichtung der Hautprobe möglich, die den späteren Erhalt longitudinal getroffener Haarfollikel ermöglichte^{46,47,199}.

Die Hautproben wurden anschließend im Einbettmedium bei –80 °C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

3.5.2 Herstellen der Kryostatschnitte

Im Forschungshaus der Hautklinik des Universitätsklinikums Charité, Campus Virchow Klinikum, wurden an einem Kryostaten (Kryostat Mod. Microm HM 500 OM; Walldorf) unter Verwendung eines C-Schliff-Messers und bei einer Verarbeitungstemperatur von etwa -35 °C aus den Proben 8µm starke Gewebsschnitte angefertigt. Die tiefgefrorenen Hautproben wurden mit Einbettmedium so auf dem Objekthalter befestigt, daß die Schnittebene des Messers eine Längsdarstellung der Haarfollikel ermöglichte. Bis zum Erreichen der richtigen Gewebeposition mußte die Probe gegebenenfalls wiederholt entfernt und neu befestigt werden, bis die orientierend durchgeführte Musterung ungefärbter, frisch geschnittener Präparate die geeignete Position der Probe zeigte. Dadurch konnten aus jeder Probe genügend Gewebsschnitte mit longitudinal angeschnittenen Follikeln gewonnen werden. Die in der Histologie gebräuchlichen Glasobjektträger wurden vor der Verwendung mit Poly-L-Lysine beschichtet. Nach Lufttrocknung der Schnitte für 20 min bei Raumtemperatur erfolgte die Lagerung bis zur Durchführung der Färbungen bei -20 °C.

Materialien, Reagenzien, Geräte
<u>Hauternte:</u> <ul style="list-style-type: none">• Kleintierscherapparat; Fa. Eickemeyer, Tuttlingen• Präparierschere; Gr.2, Aesculap GmbH, Tuttlingen• Pinzette, anatomisch; Gr.3, Aesculap GmbH, Tuttlingen• Einmalskalpelle; Nr. 11, Feather GmbH, Köln• dünner Karton; aus handelsüblicher Karteikarte zugeschnitten• handelsübliche Haushaltsaluminiumfolie; 1 Rolle• Metallöffel; hergestellt aus einem Streifen Stahlblech (0,1x2x15 cm)• Einbettmedium für Gefrierhistologie; Jung, Leica Instruments GmbH, Nussloch• flüssiger Stickstoff <u>Gefrierschnitte:</u> <ul style="list-style-type: none">• Kryostat Mod. Microm HM 500 OM; Walldorf• Glasobjektträger "Super Frust"; Fa. Menzel-Gläser, Ratingen• Poly-L-Lysine, 1 %-ig; Sigma Chemie, Deisenhofen

3.6 Neurotrophine - Immunhistochemie

3.6.1 Beschreibung der verwendeten Färbemethoden

Für die Sichtbarmachung der Neurotrophine wurden in dieser Arbeit zwei unterschiedliche Prinzipien benutzt. Die verwendeten Färbungen beruhen auf bereits etablierten und veröffentlichten Methoden für die entsprechenden Neurotrophine^{3-8,22,136,201}. Daher waren diese erprobten Methoden besonders geeignet, eine zuverlässige und auswertungsfähige Darstellung der untersuchten Neurotrophine bzw. ihrer Rezeptoren zu ermöglichen.

Beiden Färbemethoden liegt zugrunde, daß im Gewebsschnitt ein Antigen exprimiert wird, an dem ein Primärantikörper spezifisch binden kann. Der Unterschied besteht dann im wesentlichen darin, wie dieser Primärantikörper sichtbar gemacht wird:

1. Immunfluoreszenz: Der Sekundärantikörper ist mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert. Da der Sekundärantikörper am Primärantikörper bindet, kann unter dem Fluoreszenzmikroskop indirekt sichtbar gemacht werden, an welchen Orten der Primärantikörper eine spezifische Bindung eingegangen ist.

2. ABC-Färbung: Der Sekundärantikörper trägt Biotin. Er ist so gewählt, daß er gleichzeitig gegen den Primärantikörper und einen anti-AP Antikörper (alkalische Phosphatase) des im nächsten Schritt hinzugegebenen APAAP-Komplexes (alkalische Phosphatase, anti alkalische Phosphatase) gerichtet ist. Die Zugabe von ABC-AP (Avidin-Biotin-Komplex, konjugiert mit alkalischer Phosphatase) führt zur Bindung am sekundären Antikörper. Die alkalische Phosphatase liegt also am Ort der spezifischen Antigenbindung vor, was durch eine nachfolgende Farbstoffreaktion schließlich unter dem Lichtmikroskop sichtbar wird.

Materialien, Reagenzien, Geräte

- Immunologische Reagenzien, siehe unten
- Aqua destillata, Klinikapotheke UK Charité, Standort Rudolf Virchow
Klinikum
Tris-gepufferte Saline (tris buffer-saline - TBS), 0,05 M, pH=7,5, für 1l bestehend aus:
 - 8,78g NaCl; Sigma Chemie, Deisenhofen
 - 0,9g Trisbase; Sigma Chemie, Deisenhofen
 - 6,85g Trispuffer; Sigma Chemie, Deisenhofen gelöst in Aqua dest.
- 2-Amino-2-methyl-1-1,3-propandiol; Merck GmbH, Darmstadt
- Levamisol; Sigma Chemie, Deisenhofen
- Neofuchsin-Stammlösung, 5 %-ig in 2 N HCL,
Endkonzentration 0,1g/l; Chroma GmbH, Stuttgart
- Na-Nitrit; Merck GmbH, Darmstadt
- Naphthol-As-Bi-Phosphat; Sigma Chemie, Deisenhofen
- N,N-Dimethyl-formamid; Merck GmbH, Darmstadt
- 2 N HCL; Merck GmbH, Darmstadt
- Papierfilter, gefaltet; Fa. Schleicher & Schuell, Hamburg
- Kaiser's Glyceringelatine, gebrauchsfertig, Merck GmbH, Darmstadt
- Einbettmedium; Immunomount, Shandon, Pittsburgh, PA, USA
- Hoechst 33342, Sigma, St. Louis, MO, USA
- Diverses: Färbeküvetten; Deckgläser; Mayer's Hämalun

3.6.2 Durchführung der Immunfluoreszenz

Nach Fixierung der Schnitte in Azeton bei -20°C und Waschen in Tris-gepufferter Saline (TBS) wurde Ziegennormalserum (ZNS) zugegeben, um unspezifische Kreuzreaktionen zu vermeiden (die Sekundärantikörper stammen von der Ziege). Danach erfolgte die Zugabe des primären Antikörpers (bei NGF Ratte, bei allen anderen Kaninchen) mit Ziegennormalserum in TBS, der über Nacht zur Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Präparat belassen wurde.

Nach einem weiteren Waschschrift mit TBS wurden die mit Tetramethylrhodaminisothiocyanat (TRITC) konjugierten F(ab)₂ Fragmente von Ziege-anti-Ratte- bzw. Ziege-anti-Kaninchen-IgG

zusammen mit ZNS hinzugegeben. Dann wurde nach nochmaligem Waschen der Objektträger mit Hoechst 33342 (Sigma, St. Louis, MO) 10 mg/ml in TBS für 15 min gegengefärbt. Die Hoechst-Färbung interkaliert mit Strukturen des Zellkerns und macht diesen fluoreszenzmikroskopisch durch eine blaue Färbung sichtbar. Dadurch kann das erhaltene Immunfluoreszenzmuster besser mit den anatomischen Strukturen der Maushaut in Beziehung gesetzt werden.

Schließlich wurden die Präparate zum letzten Mal gewaschen und mit Einbettmedium (Immunomount, Shandon, Pittsburgh, PA) eingedeckt.

Färbeprotokoll für Immunfluoreszenz

1.	Azeton Fixierung	-20 °C	10 min
2.	Waschen mit TBS	Raumtemperatur	3x5 min
3.	Blockieren mit 10% ZNS in TBS	Raumtemperatur	20 min
4.	Primärer Antikörper 1:50 bzw. 1:100 mit 2% ZNS in TBS	Raumtemperatur	über Nacht
5.	Waschen mit TBS	Raumtemperatur	3x5 min
6.	Sekundärer Antikörper 1:200 mit 2% ZNS in TBS	37 °C	60 min
7.	Waschen mit TBS	Raumtemperatur	3x5 min
8.	Hoechst 1:10 in TBS	Raumtemperatur	15 min
9.	Waschen mit TBS	Raumtemperatur	3x5 min

Verwendete immunologische Reagenzien:

- **NGF**

- primärer Antikörper: Ratte 1:100; Pharmingen San Diego (Bestellnummer: G5141), CA, USA
- sekundärer Antikörper: Ziege anti Ratte TRITC 1:200; Jackson ImmunoResearch (112-026-003), West Grove, PA, USA
- Blockierungslösung: 2% Ziegennormalserum in TBS, Dianova GmbH, Hamburg
- Detektionssystem: fluoreszierender Sekundärantikörper⁶

- **BDNF**
 - primärer Antikörper: Kaninchen 1:50; Santa-Cruz Biotech (sc-546), Santa-Cruz, CA, USA
 - sekundärer Antikörper: Ziege anti Kaninchen TRITC 1:200; Jackson ImmunoResearch (111-026-045), West Grove, PA, USA
 - Blockierungslösung: 2% Ziegennormalserum in TBS, Dianova GmbH, Hamburg
 - Detektionssystem: fluoreszierender Sekundärantikörper^{4,22}
- **NT-4**
 - primärer Antikörper: Kaninchen 1:50; Santa-Cruz Biotech (sc-545)
 - sekundärer Antikörper: wie bei BDNF
 - Blockierungslösung: dito
 - Detektionssystem: dito^{4,22}
- **NT-3**
 - primärer Antikörper: Kaninchen 1:50; Santa-Cruz Biotech (sc-547)
 - sekundärer Antikörper: wie bei BDNF
 - Blockierungslösung: dito
 - Detektionssystem: dito^{3,22}
- **Trk-A**
 - primärer Antikörper: Kaninchen 1:50; Santa-Cruz Biotech (sc-118)
 - sekundärer Antikörper: wie bei BDNF
 - Blockierungslösung: dito
 - Detektionssystem: dito⁶
- **Trk-B**
 - primärer Antikörper: Kaninchen 1:50; Santa-Cruz Biotech (sc-12)
 - sekundärer Antikörper: wie bei BDNF
 - Blockierungslösung: dito
 - Detektionssystem: dito^{4,22}
- **Trk-C**
 - primärer Antikörper: Kaninchen 1:50; Santa-Cruz Biotech (sc-117)
 - sekundärer Antikörper: wie bei BDNF
 - Blockierungslösung: dito
 - Detektionssystem: dito³

3.6.3 Durchführung der ABC-Färbung

Nachdem die Schnitte mit Azeton fixiert und mit TBS gewaschen wurden, erfolgte unter Zwischenschaltung mehrmaliger Waschschriffe die Zugabe von Avidin und Biotin, um unspezifische Färbereaktionen zu verhindern (der Biotin-tragende sekundäre Antikörper bindet nach Zugabe eines Avidin-Biotin-Komplexes). Dann wurde nach Applikation einer Blockierungslösung, welche die Anfärbung unspezifischer Proteine verhindern soll, der primäre Antikörper mit Rindernormalserum (RNS) in TBS über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

Am nächsten Tag wurde der sekundäre Antikörper mit Kaninchennormalserum (KNS) und Mausnormalserum (MNS) zugegeben. Dann erfolgte nach nochmaligem Waschen die Zugabe von ABC-Reagenz.

Am Ende dieses Färbeprotokolls wurde eine standardisierte, auf die alkalische Phosphatase abgestimmte Farbentwicklungsreaktion durchgeführt, die einen roten Farbstoffniederschlag im Gewebe ergibt:

- Dazu wurde eine 150 ml Pufferlösung aus Tris-HCL (0,035M) hergestellt, die 0,1 M NaCl, 0,05 M 2-Amino-2-methyl-1,3-propandiol und 1,7 M Levamisol enthielt (zur Blockade endogener alkalischer-Phosphatase-Aktivität).
- Anschließend wurden 300 µl einer Neofuchsin-Stammlösung (5 %-ig in 2 N HCL, Endkonzentration 0,1g/l) langsam in eine Lösung von 30 mg Na-Nitrit in 750 µl destillierten Wassers gegeben, um diese Mischung der Pufferlösung zuzusetzen.
- Nach abschließender Zugabe des Enzymsubstrats, 0,75 g Naphthol-As-Bi-Phosphat gelöst in 900 µl N,N-Dimethylformamid, erfolgte die Einstellung des pH-Wertes der Entwicklerlösung auf 8,7.
- Vor dem sofortigen Gebrauch wurde die Lösung ultrafiltriert, um darin anschließend die Gewebsschnitte für 15 - 20 min zu inkubieren.

Nach dem letzten sorgfältigen Waschen erfolgte zwecks Sichtbarmachung der anatomischen Strukturen die Gegenfärbung in Mayer's Hämalalaun und das Eindecken der Schnitte mit Kaiser's Glyceringelatine.

Färbeprotokoll für ABC-Färbung

1.	Azeton Fixierung	–20 °C	10 min
2.	Waschen mit TBS	Raumtemperatur	3x5 min
3.	Avidin	Raumtemperatur	15 min
4.	Waschen mit TBS	Raumtemperatur	3x5 min
5.	Biotin	Raumtemperatur	15 min
6.	Waschen mit TBS	Raumtemperatur	3x5 min
7.	Blockierungslösung	Raumtemperatur	15 min
8.	Primärer Antikörper 1:100 mit 2% RNS in TBS	Raumtemperatur	über Nacht
9.	Waschen mit TBS	Raumtemperatur	3x5 min
10.	Sekundärer Antikörper 1:200 mit 2% KNS und 4% MNS in TBS	Raumtemperatur	30 min
11.	Waschen mit TBS	Raumtemperatur	3x5 min
12.	ABC 1:100 in TBS	Raumtemperatur	30 min
13.	Waschen mit TBS	Raumtemperatur	3x5 min
14.	Entwicklung	Raumtemperatur	20 min
15.	Waschen mit TBS	Raumtemperatur	3x5 min
16.	Hämalaun	Raumtemperatur	40 min

Verwendete immunologische Reagenzien:

- **P75 NTR**

- primärer Antikörper: Ratte 1:100; Chemicon International Inc. (Bestellnummer: MAB 357), Temecula, CA, USA
- sekundärer Antikörper: Biotin Ziege anti Ratte 1:200; Jackson ImmunoResearch (112-065-102), West Grove, PA, USA
- Blockierungslösung:
 - a) 2% Kaninchennormalserum und 4% Mausnormalserum in TBS; Dako GmbH, Kopenhagen, Dänemark
 - b) Avidin-Biotin-Blockierungskit; Camon Laborservice (SP 2001), Wiesbaden
 - c) Blocking-Solution; Immunotech Inc.(1481), Westbrook, MN, USA
- Detektionssystem: ABC-AP Komplex; Camon (Ak 5000)

3.7 Auswertung der Präparate

Für die Immunhistochemie wurden aus jeder Behandlungsgruppe drei Tiere untersucht, wobei mindestens zwei Schnitte pro Tier für jede Neurotrophin-Färbung angefertigt wurden. Als Kontrollgruppe wurden pro Behandlungsgruppe jeweils zwei Tiere bei sonst gleichen Bedingungen nur mit der entsprechenden Trägersubstanz behandelt.

Es wurden Kryoschnitte von transgenen Mäusen, die bestimmte Neurotrophine überexprimieren oder nicht produzieren (Knockout -/-), als Positiv- bzw. Negativkontrolle verwendet, um die Validität der verwendeten Färbeprotokolle zu überprüfen. Außerdem wurden für alle Antiseren Präparate ohne Zugabe des primären Antikörpers und Schnitte von embryonalem Hirngewebe, in denen üblicherweise hohe Konzentrationen von Neurotrophinen nachweisbar sind, als weitere Kontrollen benutzt.

Die fluoreszenz- und lichtmikroskopische Analyse erfolgte an einem Zeiss Axioskop unter Verwendung von Exzitations-Emissions-Filter-Systemen. Für die Sichtbarmachung der Hoechst-Färbung wurde entsprechend ein Filter mit dem Maximum im blauen Bereich, für die TRITC-Färbung im roten Bereich benutzt. Die P75-NTR-Färbung wurde lichtmikroskopisch ausge-

wertet. Unter einer 400-fachen Vergrößerung (40er Objektiv, 10er Okular) wurden die gefärbten Schnitte gemustert. Zur Aufnahme von Bildern wurden gegebenenfalls andere Objektive mit einer stärkeren Vergrößerung benutzt.

Für die digitale Bildanalyse war das ISIS Bildanalyse System angeschlossen, das aus einer digitalen Kamera und einem Bildverarbeitungsprogramm besteht.

Von den drei Tieren der behandelten Gruppen und jeweils zwei aus der Kontrollgruppe wurden pro Tier mindestens zwei Präparate ausgewertet und anschließend von Dr. Vladimir A.

Botchkarev, AG Haarforschung, Charité Berlin, nachbefundet. Dabei konnten pro Präparat jeweils 15 bis 20 vollständig longitudinal geschnittene Haarfollikel ausgewertet werden, also pro Tier 30 bis 40 in der gesamten Länge sichtbare Follikel.

Die semiquantitative Auswertung und Zuordnung der einzelnen Zelltypen erfolgte nach rein morphologischen Kriterien. Die einzelnen anatomischen Strukturen wurden tabellarisch zusammengefaßt und die Färbeintensität nach folgenden Abstufungsgraden bewertet:

- Negativ (-)
- Schwach Positiv (+)
- Positiv (++)
- Stark positiv (+++).

Die Veränderungen der Expressionsmuster nach Behandlung mit Zytokinen, Cyclosporin A bzw. Dexamethason wurden dann beschrieben als:

- keine Veränderung (-)
- eindeutig detektierbare Erhöhung der Immunreaktivität (↑)
- moderate Erhöhung (↑↑)
- starke Erhöhung (↑↑↑)

und in einer Tabelle zusammengefaßt.

Bei der morphometrischen Analyse der NT-4-positiven Zellen wurden nur solche immunreaktiven Zellen gezählt, die einen angeschnittenen Kern zeigten und gut zu erkennen waren.

Die statistische Auswertung und graphische Darstellung dieser Zellzählung erfolgte mit dem Statistikprogramm „Excel“ und die Weiterverarbeitung der Fotografien mit den Bildverarbeitungsprogrammen „Paintshop Pro“ und „PowerPoint“.

Materialien, Reagenzien, Geräte
<ul style="list-style-type: none">• Mikroskop, Typ: Zeiss Axioskop; Fa. Carl Zeiss, Oberkochen• ISIS image analysis system; ISIS MetaSystems, Altlussheim• IBM-kompatibler Personal Computer• Statistikprogramm „Excel“• Bildverarbeitungsprogramme „Paintshop Pro“ und „PowerPoint“

4 Ergebnisse

4.1 In der Kontrollgruppe zeigten sich für jedes Neurotrophin spezifische Färbemuster

In der semiquantitativen Auswertung der Präparate wurde für jedes Neurotrophin und jeden Neurotrophinrezeptor bei den Kontrolltieren ein bestimmtes Färbemuster erhalten, das tabellarisch zusammengefaßt wurde (siehe **Tab. 3**). Diese Verteilung der Neurotrophin- bzw. Neurotrophinrezeptor-Immunreaktivität in murinen Anagen-VI-Haarfollikeln wurde schon teilweise in den publizierten Arbeiten von Vladimir A. Botchkarev^{4,5,22,136} und Natalia V. Botchkareva^{7,8} beschrieben.

In den Keratinozyten der Epidermis fand sich eine deutliche Expression von NGF. Es konnte schon in früheren Untersuchungen eine NGF-Produktion in Keratinozyten nachgewiesen werden^{37,38}. Des weiteren fand sich eine schwache NGF-Expression in Keratinozyten der Haarmatrix, der äußeren Wurzelscheide und der Wulstzone.

Der hochaffine NGF-Rezeptor Trk-A wurde in Keratinozyten von Epidermis und äußerer Wurzelscheide deutlich exprimiert, wogegen in der Haarmatrix, der Wulstregion, der proximalen inneren Wurzelscheide und den Fibroblasten der dermalen Papille nur eine schwache Immunreaktivität nachweisbar war.

Für BDNF konnte in der Haarmatrix, der dermalen Papille, der proximalen äußeren Wurzelscheide, der Wulstregion, dem M. arrector pili und in der Epidermis eine schwache Immunreaktivität nachgewiesen werden. Deutlich positiv waren hier die Fettzellen der murinen Dermis. Eine schwache Expression von NT-4 zeigte sich in der Haarmatrix, der dermalen Papille, der äußeren Wurzelscheide, der Wulstregion und im M. panniculus carnosus.

Der hochaffine Rezeptor für BDNF und NT-4, Trk-B, wurde in der Epidermis, aber auch im M. panniculus carnosus deutlich exprimiert. In der Haarmatrix, der dermalen Papille, der äußeren Wurzelscheide und im M. arrector pili fand sich eine schwache Expression.

Besonders interessant war die starke Expression von NT-3 im M. panniculus carnosus, ein quergestreifter Muskel, der sich direkt unter der murinen Dermis befindet. Dieses könnte mit der Funktion von NT-3 bei der Herausbildung von Motoneuronen im Zusammenhang stehen. Auch in Haarfollikelkeratinozyten der Innenschicht der äußeren Wurzelscheide im Isthmusbereich des Haarfollikels fand sich eine starke NT-3-Immunreaktivität. In der proximalen äußeren

Wurzelscheide war eine deutliche, dagegen in der Haarmatrix und der dermalen Papille eine schwache Immunreaktivität nachweisbar.

Der hochaffine NT-3-Rezeptor Trk-C wurde in der Haarmatrix, der dermalen Papille und in der proximalen äußeren Wurzelscheide schwach exprimiert.

Für den niedrigaffinen, gemeinsamen Rezeptor p75 NTR war bei den Kontrolltieren nur in Keratinozyten der proximalen äußeren Wurzelscheide eine schwache Immunreaktivität nachweisbar. Einen zusammenfassenden Überblick der Neurotrophinmuster bei der vehikelbehandelten Kontrollgruppe gibt **Tab. 3**.

Tabelle 3: Färbemuster der Neurotrophine bzw. ihrer Rezeptoren in Anagen-VI-Haarfollikeln der Kontrollgruppe

Abkürzungen: HM=Haarmatrix; DP= dermale Papille; ÄWS=äußere Wurzelscheide; IWS=innere Wurzelscheide; APM=Musculus arrector pili; PCM= Musculus panniculus carnosus; NGF=nerve growth factor; BDNF=brain derived neurotrophic factor; NT-3 und-4=Neurotrophin-3 und-4; Trk-A,-B,-C= Tyrosinkinaserzeptor-A,-B,-C; p75 NTR= p75 Neurotrophinrezeptor

Negative IR: -

Schwach positive IR: +

Positive IR: ++

Stark positive IR: +++

	HM	DP	ÄWS	IWS	Wulst	APM	Isthmus	PCM	Epidermis
NGF	+	-	+	-	+	-	-	-	++
BDNF	+	+	+	-	+	+	-	-	+
NT-4	+	+	+	-	+	-	-	+	-
NT-3	+	+	++	-	-	-	+++	+++	-
Trk-A	+	+	++	+	+	-	-	-	++
Trk-B	+	+	+	-	-	+	-	++	++
Trk-C	+	+	+	-	-	-	-	-	-
P75 NTR	-	-	+	-	-	-	-	-	-

4.2 Verschiedene Zytokine regulieren NGF in ÄWS und HM hoch

Die Zytokine TNF- α , IFN- γ und IL-1 β sowie ein Cocktail aus den drei Zytokinen bewirkten eine eindeutig detektierbare (\uparrow) Hochregulation der NGF-Immunreaktivität in der proximalen äußeren Wurzelscheide und in der Haarmatrix (siehe **Abb. 14**).

Die Expression von NGF in Keratinozyten von Wulstregion und Epidermis war gegenüber der Kontrollgruppe unverändert.

Es zeigte sich in allen NGF-Färbungen von Tieren der Kontroll- und Behandlungsgruppe ein interessantes asymmetrisches Färbemuster in der Haarmatrix. Dieses Muster war immer so verteilt, daß das Areal mit der höheren Intensität der der Epidermis zugewandte Teil der HM war, also nach dorsokranial zeigte (siehe **Abb. 16**).

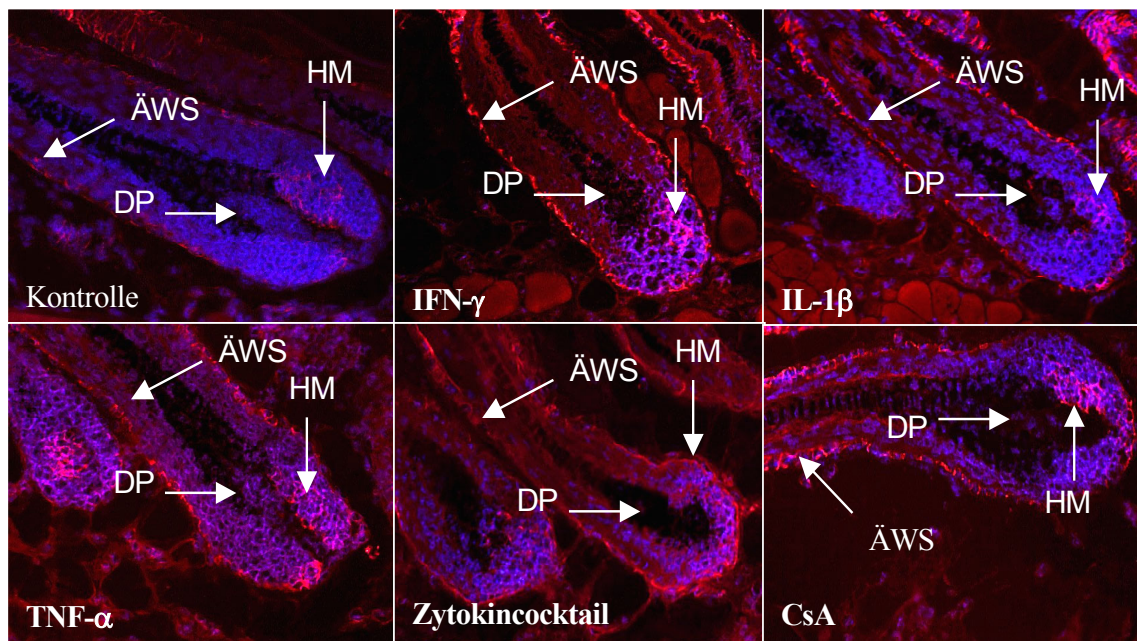


Abbildung 14: Darstellung der NGF-Immunreaktivität in HM und ÄWS

Die Zytokine IFN- γ , IL-1 β und TNF- α sowie der Zytokincocktail, aber auch CsA regulieren die NGF-Expression in Haarmatrix und proximaler äußerer Wurzelscheide im Vergleich zur Kontrolle deutlich hoch.

Abkürzungen: ÄWS=äußere Wurzelscheide; HM=Haarmatrix; DP=dermale Papille

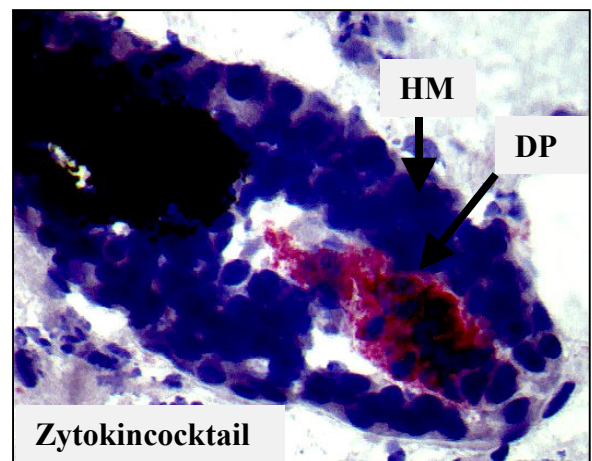
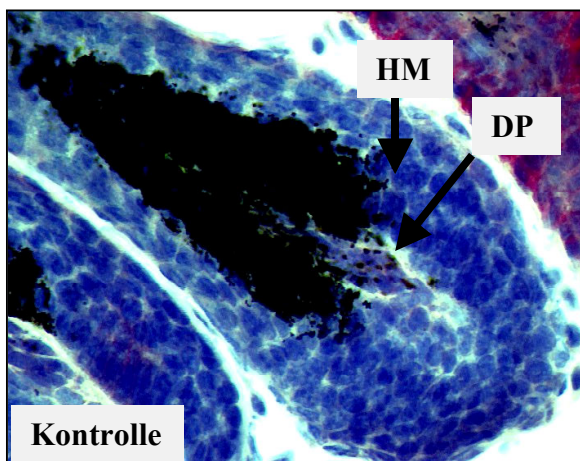


Abbildung 15: Darstellung der p75 NTR-Immunreaktivität in der dermalen Papille

Nach Behandlung mit dem Zytokincocktail ist die p75 NTR-Expression in der dermalen Papille gegenüber der Kontrolle moderat erhöht.

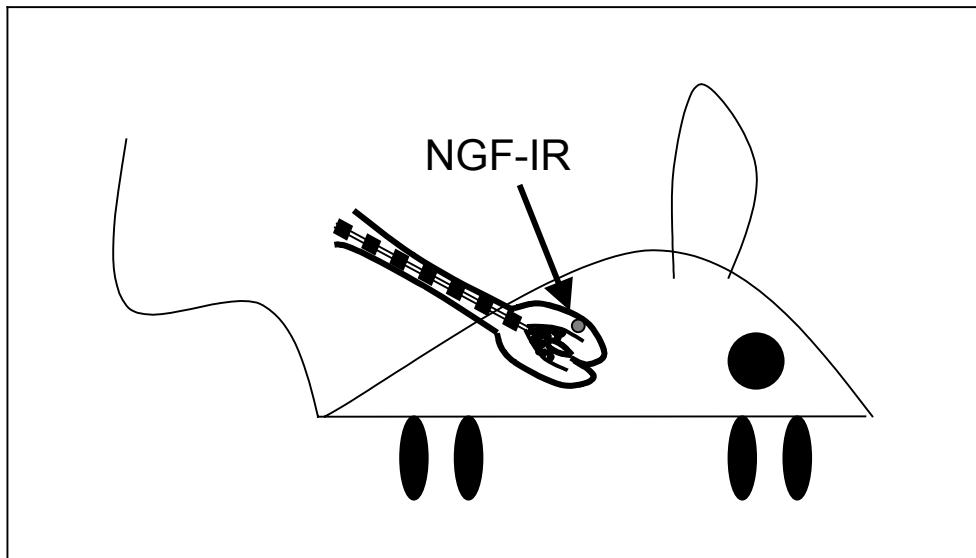


Abbildung 16: Schematische Darstellung der Lokalisation der NGF-IR unter Verwendung von Immunfluoreszenz im murinen Haarfollikel

Die NGF-Immunreaktivität zeigte sich jedes Mal an der Seite des Haarfollikels, die der Epidermis zugewandt ist. Da das Haar insgesamt nach kaudal geneigt ist, zeigte die NGF-IR also nach dorsokranial.

4.3 Der Zytokincocktail reguliert p75 NTR in der DP hoch

Während keine der Behandlungsmodalitäten eine Veränderung des Expressionsmusters der hochaffinen Tyrosinkinase Rezeptoren Trk-A, -B oder -C bewirkte, wurde die Immunreaktivität von p75 NTR durch Behandlung mit dem Zytokincocktail in den Fibroblasten der dermalen Papille moderat (↑↑) erhöht (siehe Abb. 15).

Die schon in der Kontrollgruppe nachweisbare Expression in der proximalen äußeren Wurzelscheide war unverändert nachweisbar.

4.4 Der Zytokincocktail reguliert NT-3 und NT-4 in der Epidermis hoch

Nur der Zytokincocktail, jedoch keine der anderen Behandlungsmodalitäten, resultierte in einer starken Erhöhung (↑↑↑) der Immunreaktivität von NT-3 und NT-4 in Keratinozyten der Suprabasalschicht der murinen Epidermis (siehe **Abb. 17**).

Die NT-3-Expression im M. panniculus carnosus, im Isthmusbereich der äußeren Wurzelscheide, in der proximalen äußeren Wurzelscheide, in der Haarmatrix und in der dermalen Papille war im Vergleich zu der Kontrollgruppe unverändert.

4.5 Der Zytokincocktail reguliert NT-4 in Zellen von ÄWS und HM hoch

Ebenfalls durch den Zytokincocktail kam es zu einer starken Hochregulation (↑↑↑) der Immunreaktivität von NT-4 in selektierten Zellpopulationen von proximaler äußerer Wurzelscheide und Haarmatrix (siehe **Abb. 18**). Die Quantifizierung dieser in der Kontrollgruppe nicht nachweisbaren Zellen zeigte eine starke Hochregulation nach Behandlung mit dem Cocktail (siehe **Abb. 19**).

Die Expression von NT-4 in der dermalen Papille, der Wulstregion und im M. panniculus carnosus war im Vergleich zu der bei den Kontrolltieren nicht verändert.

Die Expression von BDNF, Trk-A, Trk-B und Trk-C in murinen Anagen-VI-Haarfollikeln bzw. Dermis und Epidermis wurde durch die intradermale Gabe dieser Zytokine nicht verändert. Die Expressionsmuster entsprachen auch nach der Zytokinbehandlung denen der Kontrolltiere (siehe **4.1**).

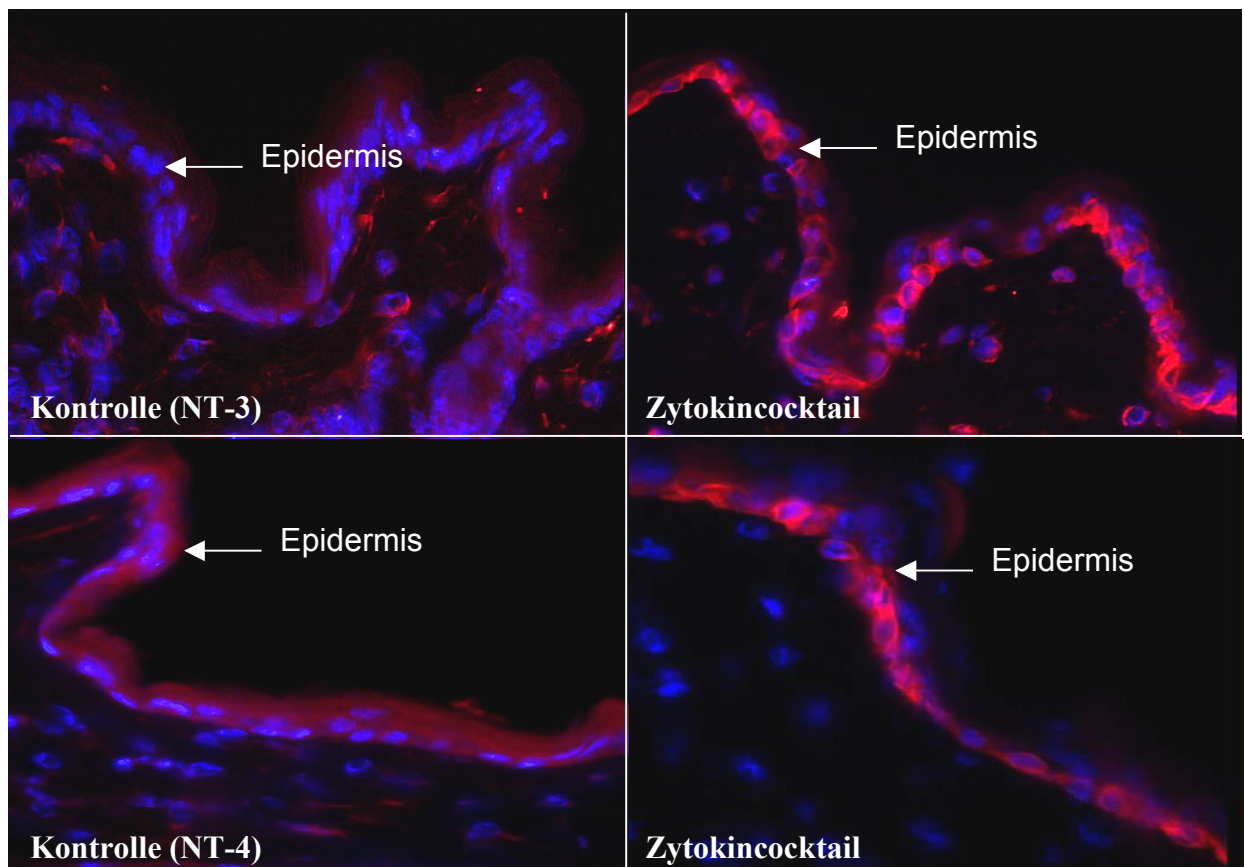


Abbildung 17: Darstellung der NT-3- und NT-4-Immunreaktivität in der Epidermis

Die Expression von NT-3 (oben) und NT-4 (unten) wurde durch Behandlung mit dem Zytokincocktail in der Epidermis gegenüber der Kontrollgruppe stark erhöht.

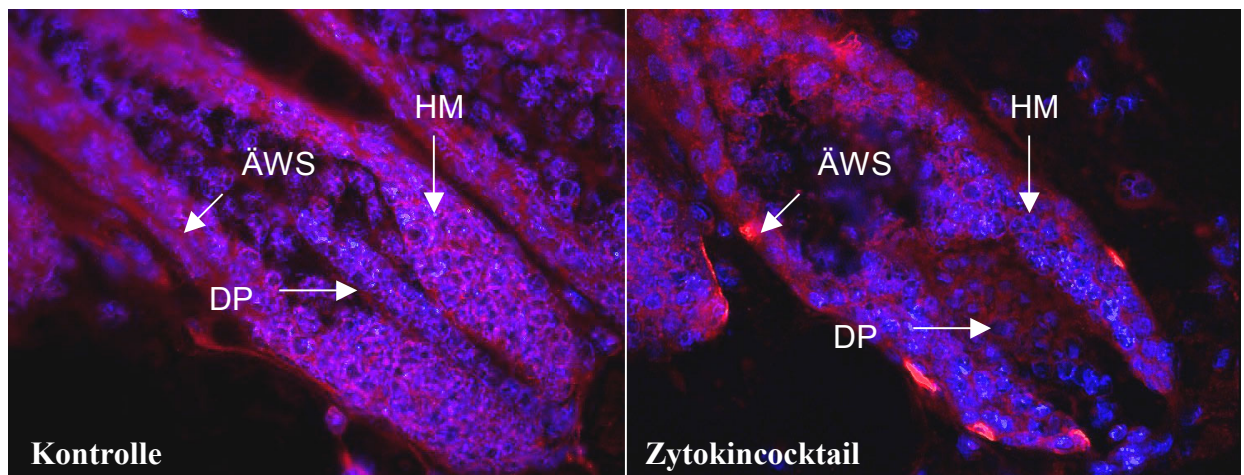


Abbildung 18: Darstellung der NT-4-Immunreaktivität in HM und ÄWS

Nach Behandlung mit dem Zytokincocktail wurde eine starke Hochregulation der NT-4-Expression in selektierten Zellpopulationen von proximaler äußerer Wurzelscheide und Haarmatrix nachgewiesen.

Abkürzungen: ÄWS=äußere Wurzelscheide; DP=dermale Papille; HM=Haarmatrix

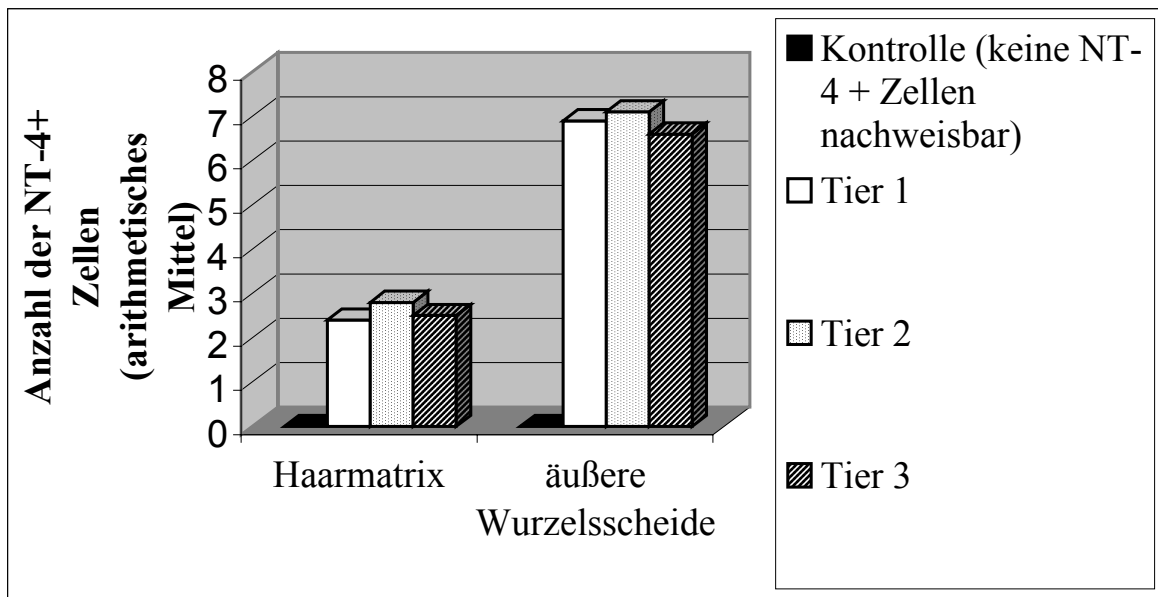


Abbildung 19: Quantifizierung der NT-4-positiven Zellen in proximaler ÄWS und HM

Die Quantifizierung der NT-4-positiven Zellen pro Haarfollikel in proximaler Wurzelsscheide und Haarmatrix zeigt eine starke Hochregulation nach Behandlung mit dem Zytokincocktail. Untersucht wurden jeweils drei mit dem Zytokincocktail behandelte Tiere und zwei Kontrolltiere mit je 30 bis 40 vollständig longitudinal dargestellten Follikeln.

4.6 CsA erhöht die NGF-Expression in ÄWS und HM

Interessanterweise konnte auch durch die intraperitoneale Cyclosporin-A-Applikation eine Hochregulation (↑) von NGF in HM und proximaler ÄWS erreicht werden, wie bereits für die Zytokine und den Zytokincocktail in Kapitel 4.2 beschrieben (siehe **Abb. 14**).

Die Expressionsmuster von NT-3, NT-4, BDNF, Trk-A, Trk-B, Trk-C sowie p75 NTR blieben nach der CsA-Behandlung unverändert und entsprachen den jeweiligen Expressionsmustern bei den Kontrolltieren.

4.7 Dexamethason bewirkt keine Veränderungen des NT-Musters

Dexamethason induzierte keine Veränderungen der Neurotrophin- bzw. Neurotrophinrezeptor-expression. Es fanden sich jeweils mit denen der Kontrollgruppe identische Expressionsmuster von Immunreaktivität aller Neurotrophine und ihrer Rezeptoren.

Einen zusammenfassenden Überblick über die verschiedenen Veränderungen nach Behandlung mit Zytokinen, Cyclosporin A oder Dexamethason gibt **Tabelle 4**.

Die beobachteten Veränderungen der Neurotrophin-Expression sind noch einmal schematisch für NGF und NT-4 in **Abb. 20** sowie für NT-3, NT-4 und p75 NTR in **Abb. 21** dargestellt. Dabei wurde der Übersichtlichkeit halber auch für die Kontrollgruppe jeweils nur die Immunreaktivität dargestellt, bei der es nach Behandlung mit einem Zytokin bzw. Cyclosporin A zu einer Änderung der Expression kam. Die Expressionsmuster, die sich nach Behandlung nicht veränderten, wurden in dieser Darstellung vernachlässigt.

Tabelle 4: Änderungen der Immunreaktivität in murinen Anagen-VI-Haarfollikeln nach Behandlung mit Zytokinen (intradermal), CsA (intraepitoneal) oder Dexamethason (topisch) im Vergleich zu den mit Trägerstoff behandelten Kontrolltieren

Abkürzungen: IFN- γ =Interferon- γ ; IL-1 β =Interleukin-1 β ; TNF- α =Tumornekrosefaktor- α ; CsA=Cyclosporin A; Dexa=Dexamethason; NGF=nerve growth factor; BDNF=brain derived neurotrophic factor; NT-3 und -4=Neurotrophin-3 und -4; Trk-A,-B,-C= Tyrosinkinaserzeptor-A,-B,-C; p75 NTR= p75 Neurotrophinrezeptor; HM=Haarmatrix; prox. ÄWS=proximale äußere Wurzelscheide; DP=dermale Papille

Keine Veränderung der IR: –
 Eindeutig detektierbare Erhöhung der IR: ↑
 Moderate Erhöhung der IR: ↑↑
 Starke Erhöhung der IR: ↑↑↑

	IFN- γ	IL-1 β	TNF- α	IFN- γ + IL-1 β + TNF- α	CsA	Dexa
NGF	HM ↑ prox. ÄWS ↑	HM ↑ prox ÄWS ↑	HM ↑ prox. ÄWS ↑	HM ↑ prox. ÄWS ↑	HM ↑ prox. ÄWS ↑	–
NT-4	–	–	–	Epidermis ↑↑↑ selektierte Zellen in HM & ÄWS ↑↑↑	–	–
NT-3	–	–	–	Epidermis ↑↑↑	–	–
BDNF	–	–	–	–	–	–
p75 NTR	–	–	–	DP ↑↑	–	–
Trk-A	–	–	–	–	–	–
Trk-B	–	–	–	–	–	–
Trk-C	–	–	–	–	–	–

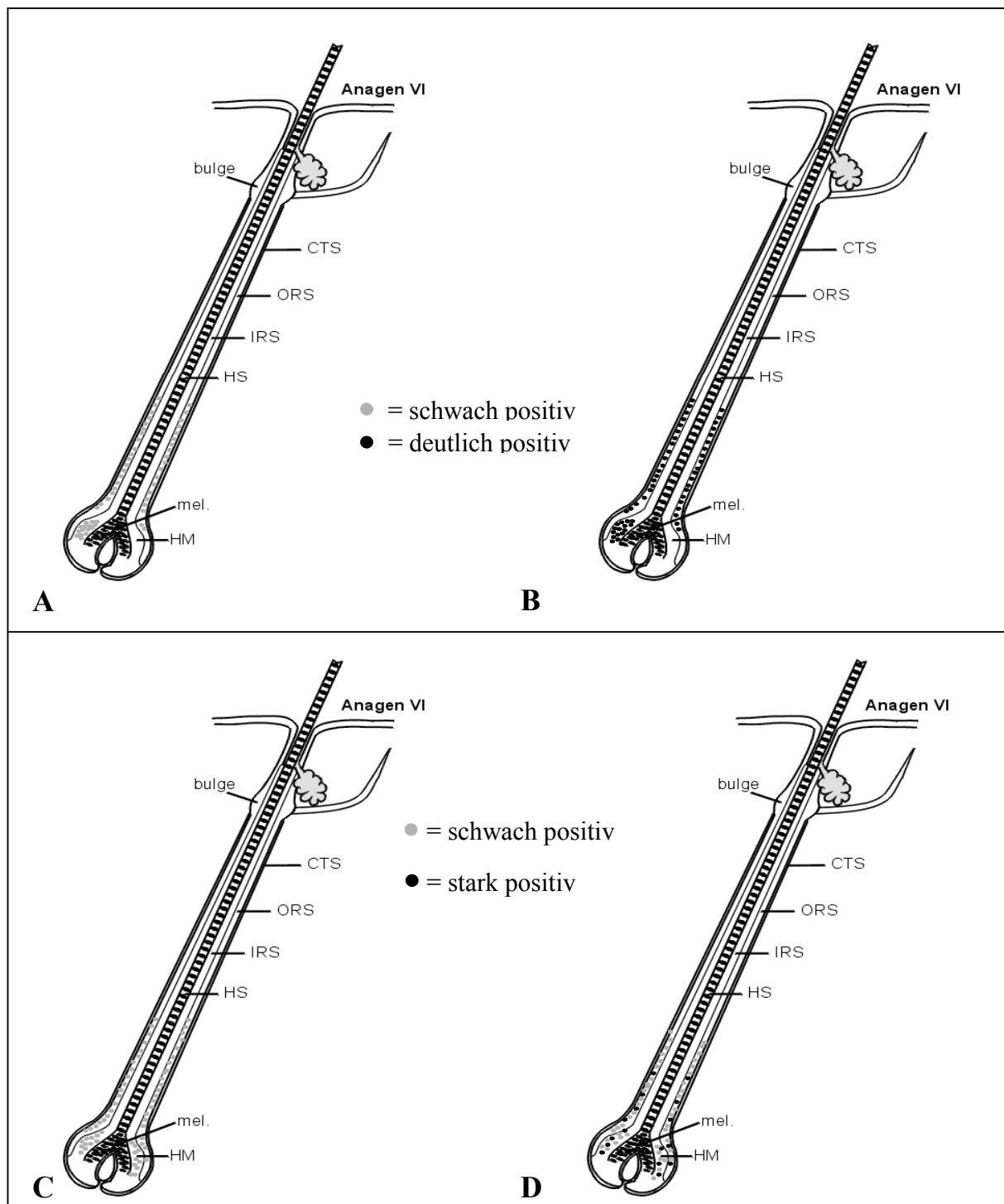


Abbildung 20: Schematische Darstellung der Änderungen der Immunreaktivität in murinen Anagen-VI-Haarfolikeln für NGF und NT-4

NGF: In der Kontrollgruppe (A) zeigte sich in der proximalen äußeren Wurzelscheide sowie in der Haarmatrix eine schwache Immunreaktivität (IR) für NGF (konstante Expressionsmuster sind nicht dargestellt), nach Behandlung mit IFN- γ , IL-1 β , TNF- α , dem Cocktail sowie CsA war hier eine deutlich positive IR zu verzeichnen (B).

Für NT-4 zeigte sich in der Kontrollgruppe (C) eine schwache IR in Haarmatrix und proximaler äußerer Wurzelscheide, nach Behandlung mit dem Zytokincocktail eine stark positive IR in selektierten Zellpopulationen (D).

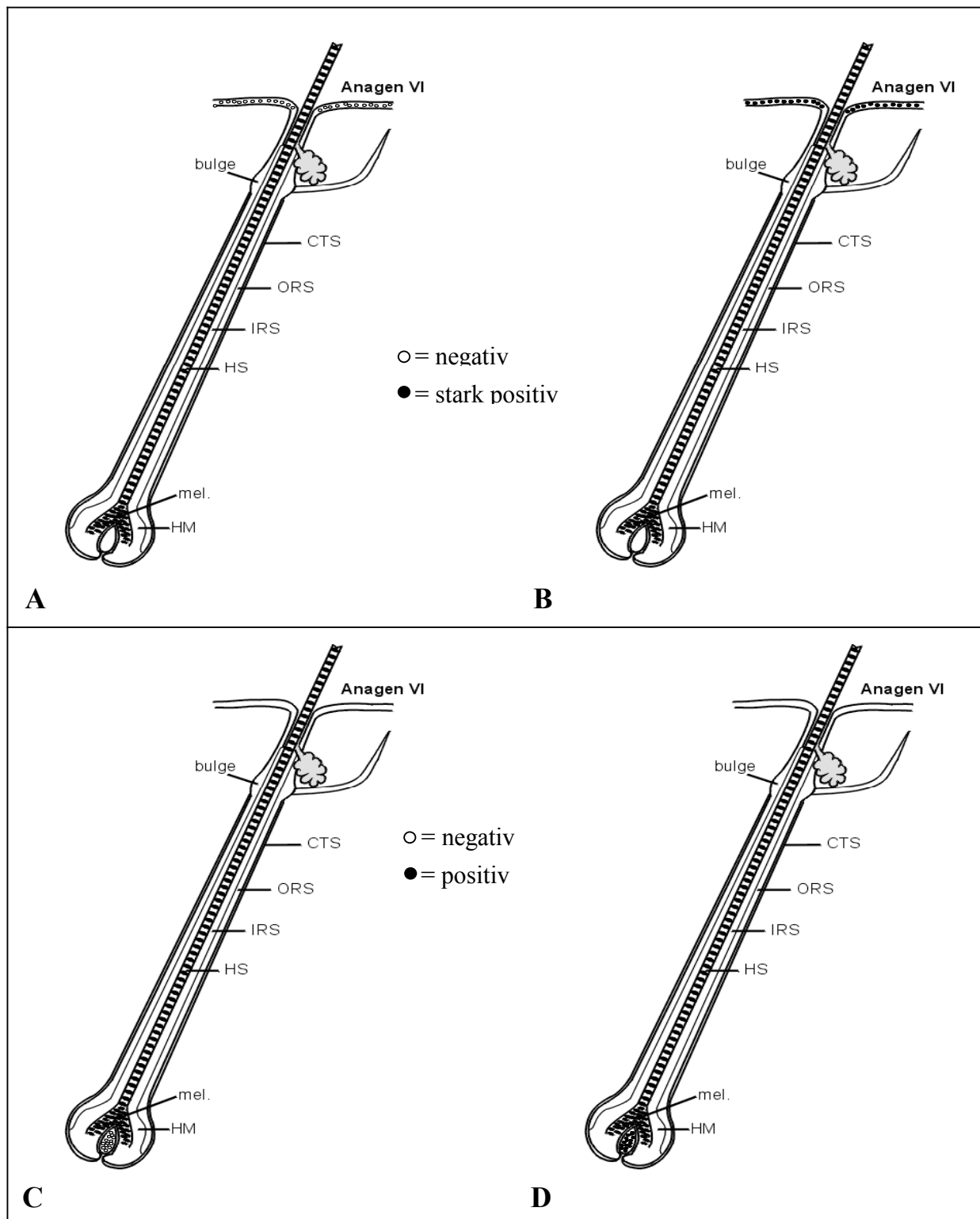


Abbildung 21: Schematische Darstellung der Änderungen der Immunreaktivität in murinen Anagen-VI-Haarfollikeln für NT-3 und p75 NTR

NT-3 und NT-4: In der Kontrollgruppe (A) zeigte sich keine Immunreaktivität in der Epidermis (konstante Expressionsmuster nicht dargestellt), nach Behandlung mit dem Zytokincocktail war hier eine stark positive IR zu verzeichnen (B).

Für p75 NTR zeigte sich in der Kontrollgruppe (C) keine IR in der dermalen Papille, nach Behandlung mit dem Zytokincocktail eine positive IR (D).

5 Diskussion

5.1 Modellbetrachtung

5.1.1 Fragestellung und Methodik

In dieser Arbeit wurde die Frage untersucht, ob es einen Zusammenhang zwischen der Exposition der Haut mit Zytokinen und der Expression von Neurotrophinen im Haarfollikel gibt. Da sowohl Zytokine als auch Neurotrophine über zahlreiche haarwuchsmodulierende Eigenschaften verfügen und zusätzlich bereits der Einfluß des Systems Zytokine auf das System Neurotrophine in verschiedenen Zellen und Geweben bekannt ist, ergaben sich daraus im wesentlichen zwei Fragestellungen:

- Gibt es den stimulierenden Einfluß der Zytokine auch auf der Ebene des betrachteten Systems Haarfollikel?
- Läßt sich daraus ein kausaler, evtl. funktionell bedeutsamer Zusammenhang herleiten?

Die Hypothese für die vorliegende Arbeit lautet daher: Es gibt einen direkten oder indirekten positiven Einfluß der Zytokine auf die Expression von Neurotrophinen auch im Haarfollikel. Diese Veränderung der Expression könnte von funktioneller Bedeutung sein, da für beide Systeme im wesentlichen gleichsinnige Effekte auf den Haarzyklus bekannt sind. Die Herleitung einer Kausalität im Sinne einer essentiellen Bedeutung für das Ablaufen des Haarzyklus bzw. für Teile dieses Zyklus konnte und sollte in dieser Arbeit nicht geleistet werden.

Ebenfalls betrachtet wurden Cyclosporin A und Dexamethason, da beide auf den Zytokinstoffwechsel inhibierend wirken und zusätzlich haarwuchsmodulierende Eigenschaften besitzen. Der Nachteil von Dexamethason ist jedoch, daß es relativ unselektiv ist und nicht nur auf die Zytokinexpression und das Haarwachstum wirkt, sondern, wie bereits in neuronalen Zellen und Geweben gezeigt werden konnte, wahrscheinlich auch das Neurotrophinmilieu direkt beeinflußt. Um die oben genannte Hypothese zu überprüfen, wurde folgendes wissenschaftliche Modell verwendet: Die entsprechenden Zytokine und CsA sowie Dexamethason wurden nach dem Vorbild vorhergehender Untersuchungen so appliziert, daß anhand der Dosis und Applikationsweise von einer suffizienten haarwuchsmodulierenden Wirkung auszugehen war (siehe 3.2 bis 3.4). Als Tiermodell wurde dafür die C57BL/6-Maus verwendet, da sie sich aufgrund ihrer

Eigenschaften als exzellentes Modell für die Haarforschung besonders bewährt hat (siehe 2.6). Nach Erreichen des Anagen VI wurde die Haut nach einer standardisierten Methode geerntet und weiterverarbeitet. Zur Auswertung der Präparate wurden immunhistochemische Färbungen vorgenommen, deren Spezifität und Sensitivität bereits in Voruntersuchungen überprüft worden war (siehe 3.6).

5.1.2 Mögliche Schlußfolgerungen

Die gewonnen Erkenntnisse sind zunächst rein deskriptiver Natur. Aufgrund der veränderten Expressionsmuster läßt sich kein direkter Rückschluß auf kausale Zusammenhänge oder eine funktionelle Bedeutung während des Haarzyklus ziehen. Dafür wären andere Experimente notwendig, die z.B. zeigen könnten, daß bei Blockade der zytokininduzierten Neurotrophin-erhöhung die Funktion des Haarzyklus verändert wird. Über eine funktionelle Bedeutung kann jedoch spekuliert werden.

Die Frage nach dem Zusammenhang der Zytokine bzw. Cyclosporin A und Dexamethason mit der Expression der Neurotrophine kann jedoch in der Tendenz beantwortet werden. Da durch eine genügend hohe Anzahl von Versuchstieren und untersuchten Objektträgern bei konstanten Veränderungen eine rein zufällige Erhöhung der Neurotrophin-Expression unwahrscheinlich wird (Nullhypothese: die Neurotrophin-Expression ist in der Experimentalgruppe gegenüber der Kontrollgruppe nicht verändert), kann eine Evidenz für den Wahrheitsgehalt der untersuchten Hypothese angenommen werden.

Eine Untermuerung der Ergebnisse durch statistisch-mathematische Betrachtungen konnte durchgeführt werden. Es handelt sich im wesentlichen um eine Beschreibung von veränderten Expressionsmustern, die einer semiquantitativen Bewertung zugänglich sind, aber dabei von der subjektiven visuellen Einschätzung des Untersuchers abhängen.

Bei der statistischen Auswertung im U-Test nach Wilcoxon, Mann und Whitney ergab sich für die hier verwendete Anzahl der Tiere bei getrennter Betrachtung von Kopf- und Schwanzregion eine Signifikanz bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit α von 0,01. Dieses Vorgehen ist dadurch begründet, daß im Prinzip jeder Haarfollikel ein in sich abgeschlossenes System darstellt und praktisch verschiedene Expressionsmuster auch in benachbarten Follikeln auftreten können, jeder Follikel also theoretisch einen eigenen Mikrokosmos bildet⁵⁰.

5.1.3 Grenzen und Mängel des Modells

Aus experimentaltheoretischen Gründen wäre zu fordern, daß die beobachteten Veränderungen eine Aussage über einen Zusammenhang zwischen den betrachteten Systemen zulassen und nicht von anderen Größen modifizierbar sind²⁰². Dies bedeutet, daß bei einer monokausalen Hypothese eine geprüfte unabhängige Variable praktisch die gesamte Variabilität der abhängigen Variable erklärt. Dies ist jedoch in einem komplexen System wie der Maus nicht ohne weiteres anzunehmen. Vorausgesetzt, die Tiere sind unter idealerweise vollkommen identischen Bedingungen untersucht worden, so bleiben immer noch einige systematische Fehlerquellen übrig, die eine sogenannte Sekundärvariation verursachen können und daher möglichst auszuschließen bzw. zu kontrollieren sind:

Durch die Verwendung von Kontrolltieren, die nur mit einer Trägersubstanz ohne Wirkstoff behandelt wurden, läßt sich ausschließen, daß die Prozedur der Substanzapplikation an sich schon den beobachteten Effekt verursacht hat (falsch positiv). Weiterhin kann durch die Verwendung von Positivkontrollen, wie z.B. embryonalem Nervengewebe, bei den immunhistochemischen Färbungen ein falsch negatives Ergebnis für die Expression der untersuchten Substanz verringert werden. Eine weitere systematische Fehlerquelle ist die evtl. mangelhafte Beobachterobjektivität, die durch die subjektive Auswertung der Präparate am Mikroskop zustande kommt. Diese Beobachterobjektivität kann mittels Nachbefundung der Präparate nach den gleichen Kriterien durch weitere Beobachter verbessert werden.

Umwelteinflüsse wie Temperatur, Luftfeuchtigkeit, UV-Strahlung und Vibrationen können Einfluß auf den gesamten Versuchsablauf nehmen, ohne daß eine vollkommene Kontrolle darüber möglich wäre. Weitere bisher nicht bekannte Störgrößen kann man letztendlich ebenfalls nicht ausschließen. Diese nicht systematischen Fehlerquellen und Meßfehler werden unter Zufallsvariation zusammengefaßt.

Idealerweise müssen also Sekundärvariation und Zufallsvariation einen sehr geringen Einfluß auf die untersuchten Zusammenhänge haben. Dies sollte so weit wie möglich durch die oben beschriebene Kontrolle systematischer und die Minimierung unsystematischer Fehlerquellen erfolgen.

Schließlich ist zu hinterfragen, ob das verwendete Modell überhaupt die untersuchte Fragestellung bzw. Hypothese abbildet oder ob die Ergebnisse der Untersuchung eigentlich zu anderen Schlußfolgerungen als denen der Ausgangshypothese führen müßten bzw. ob das Mausmodell eine adäquate Operationalisierung der Fragestellung ist. Denkbar wäre z.B., daß eine

systematische Störgröße die Neurotrophinexpression so beeinflusst hat, daß eigentlich ein Zusammenhang zwischen der nicht untersuchten Störgröße und dem untersuchten Effekt vermutet werden müßte. Diese hypothetische Störgröße müßte in den Präparaten gleichsinnige oder keine Expressionsveränderungen hervorrufen, in den Kontrollen jedoch nicht. Da durch oben beschriebene Maßnahmen versucht wurde, systematische Störgrößen zu eliminieren bzw. zu vermindern, ist die Wahrscheinlichkeit eines reinen Zufallseffektes als relativ gering einzuschätzen.

5.2 Zusammenfassung der Ergebnisse

Durch Untersuchung immunhistologischer Präparate von Rückenhaut mit Haarfollikeln im Anagen-VI-Stadium konnten Erkenntnisse über den Zusammenhang von Zytokinmilieu und Neurotrophinexpression in muriner Haut gewonnen werden. Dafür wurden Tiere intradermal mit den Zytokinen TNF- α , IFN- γ oder Il-1 β bzw. einem Cocktail mit entsprechenden Anteilen aller drei Zytokine, intraperitoneal mit Cyclosporin A oder mit topisch appliziertem Dexamethason behandelt. Nach Darstellung der Neurotrophine NGF, BDNF, NT-4, NT-3 und ihrer Rezeptoren Trk-A, Trk-B, Trk-C sowie p75 NTR mittels Immunfluoreszenz bzw. ABC-Färbung konnte die Expression nach Behandlung mit der vehikelbehandelten Kontrollgruppe verglichen werden. Dabei ergaben sich nach der semiquantitativen Auswertung der immunhistologischen Schnitte folgende Ergebnisse:

- Die Zytokine TNF- α , IFN- γ und Il-1 β erhöhten deutlich die NGF-Expression in der Haarmatrix und in der proximalen äußeren Wurzelscheide.
- Ein Cocktail aus TNF- α , IFN- γ und Il-1 β erhöhte ebenfalls deutlich die Expression von NGF in der Haarmatrix und der proximalen äußeren Wurzelscheide, er erhöhte stark die NT-3- und NT-4-Expression in der Epidermis, bewirkte eine moderate Erhöhung der Expression von p75 NTR in der dermalen Papille und eine starke Erhöhung der Immunreaktivität von NT-4 in selektierten Zellpopulationen von proximaler äußerer Wurzelscheide und Haarmatrix.

- Cyclosporin A erhöhte auf die gleiche Art wie die Zytokine und der Zytokincocktail deutlich die NGF-Expression in der Haarmatrix und in der proximalen äußeren Wurzelscheide.
- Nach topischer Gabe von Dexamethason war keine Veränderung des Expressionsmusters der Neurotrophine bzw. ihrer Rezeptoren festzustellen.

Aufgrund dieser Ergebnisse gibt es Evidenz dafür, daß sowohl proinflammatorische Zytokine als auch das Immunsuppressivum Cyclosporin A in der Lage sind, die *In-vivo*-Expression bestimmter Neurotrophine und ihrer Rezeptoren in muriner Haut zu beeinflussen. In vielen nicht-kutanen Geweben und Zellen, v.a. in Neuronen und Gliazellen, wurde ein derartiger Zusammenhang bereits beschrieben^{14-18,170-174}. Die ersten Erkenntnisse wurden von Lindholm et al. gewonnen, der herausfand, daß in Kulturen von Rattenfibroblasten IL-1 die Stabilität und Transkription von NGF-mRNA erhöht²⁰³ sowie in geschädigten Nerven von Ratten eine erhöhte NGF-Produktion durch die Freisetzung von IL-1 aus Makrophagen bewirkt wird²⁰⁴.

Auch für TNF- α und IFN- γ wurde ein positiver Einfluß auf die NGF-Expression in Fibroblasten nachgewiesen¹⁴⁻¹⁶. Der positive Zusammenhang zwischen Zytokinen und Neurotrophinen wurde ebenfalls an Mesangiumzellen von Ratten¹⁷, an Synovia von Mäusen¹⁷⁶ und an Mastzellen¹⁸⁰ nachgewiesen.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Resultate stimmen also mit den genannten Arbeiten insofern überein, daß es sich auch hier um einen stimulierenden Einfluß von Zytokinen auf Neurotrophine handelt.

5.3 Interpretation der Resultate

5.3.1 NGF

NGF und Trk-A werden in den verschiedenen Stadien der Morphogenese vor allem in Keratinozyten von Epidermis und proximaler äußerer Wurzelscheide exprimiert⁶. Für den Verlauf während des Haarzyklus nach der Morphogenese liegen derzeit noch keine publizierten Daten vor. Es könnte von einiger Bedeutung für den Verlauf des Haarzyklus sein, wenn, wie in dieser Arbeit gezeigt, nach Zytokin- bzw. Cyclosporin-A-Applikation in der Haarmatrix und in der proximalen äußeren Wurzelscheide eine erhöhte NGF-Expression vorliegt, da schon ein modu-

lierender Effekt von NGF auf die Morphogenese nachgewiesen wurde⁶. Wie in 5.4. beschrieben, spielt NGF als Prototyp der Neurotrophine bei verschiedenen Prozessen in der Haut eine wichtige Rolle und ist besonders bedeutsam bei Entzündungsprozessen. Denkbar wäre also, daß nicht nur NGF, wie bereits bekannt, auf Entzündungen Einfluß nimmt, sondern auch bei Entzündungsprozessen über Zytokine und NGF ein indirekter Einfluß auf die Neubildung von Haaren genommen werden kann. Diese Haarwachstumsinduktion könnte wiederum verschiedene Heilprozesse im Rahmen des entzündlichen Geschehens unterstützen⁵⁰.

5.3.2 P75 NTR

Die Erhöhung der Expression von p75 NTR ist ein interessanter Befund. In normaler, unbehandelter Haut von Mäusen läßt sich in den Anagen-VI-Haarfollikeln p75 NTR nur in der äußeren Wurzelscheide, nicht aber in der dermalen Papille nachweisen. Lediglich in frühen Phasen der Haarfollikelentwicklung konnte eine Immunreaktivität von p75 NTR in Fibroblasten der dermalen Papille bzw. ihrer Vorform nachgewiesen werden, die dann ab dem Stadium 7-8 der Morphogenese fehlt^{7,136}. Die dermale Papille exprimiert also durch die Behandlung mit dem Zytokincocktail wieder den Rezeptor, der eigentlich in der Entwicklung des Haarfollikels wichtig ist. Da die Kommunikation zwischen mesenchymaler dermalen Papille und haarproduzierendem ektodermalen Epithel für die Biologie des Haarfollikels eine besondere Rolle spielt²⁰⁵, unterstreicht dieses Resultat die funktionelle Wichtigkeit, die eine Veränderung des Neurotrophinmilieus durch Zytokine haben könnte.

5.3.3 NT-3

Die Funktion der erhöhten Immunreaktivität von NT-3 in der Epidermis nach Behandlung mit dem Zytokincocktail für den Zyklus des Haarfollikels ist nicht eindeutig benennbar. Während des normalen Haarzyklus findet sich keine Expression von NT-3 oder des hochaffinen Rezeptors Trk-C in der Epidermis⁵. In frühen Stadien der Morphogenese (Stadium 1-5) dagegen wird Trk-C in Keratinozyten der Epidermis exprimiert. Zur gleichen Zeit findet sich NT-3 in Fibroblasten der sich bildenden dermalen Papille, was wiederum ein Indiz für die Wichtigkeit der mesenchymal-ektodermalen Interaktion in dieser Region ist. In späteren Stadien der Morphogenese (Stadium 6-8) findet sich eine NT-3-IR auch in Keratinozyten der äußeren Wurzelscheide und weiterhin in der dermalen Papille³. Somit scheint eine Veränderung der Expression von NT-3 in der Epidermis nach Zytokingabe nicht direkt den Haarzyklus zu beeinflussen, da es

wahrscheinlich von der so wichtigen Interaktion zwischen dermalen Papille und Epithel zu weit entfernt liegt.

Denkbar wäre allerdings, daß diese NT-3-Hochregulation eine physiologische Funktion bei der Antagonisierung der entzündungsinduzierten Hyperalgesie einnimmt¹⁷⁸. Diese ist ein gutes Beispiel für die funktionelle Bedeutung der Interaktion von Neurotrophinen und Entzündungsmediatoren, die auch für klinische Fragestellungen von großer Bedeutung sein kann. Es könnten sich therapeutische Konsequenzen für die Behandlung entzündungsbedingter Schmerzen ergeben, die noch in weiteren Studien zu prüfen wären. Auch zeigen diese Ergebnisse, daß es prinzipiell möglich ist, durch Zytokinapplikation die Expression von NT-3 in Keratinozyten zu erhöhen. So wäre es durchaus denkbar, daß bei anderen Zytokinkonzentrationen auch die Keratinozyten in Haarmatrix und äußerer Wurzelscheide eine veränderte NT-3-Expression aufweisen, was dann einen empfindlichen Einfluß auf die „innere Uhr“ des Haarfollikels haben sollte.

5.3.4 NT-4

Die Erhöhung der Expression von NT-4 in der Epidermis ist wahrscheinlich ähnlich wie die von NT-3 nicht primär für die Beeinflussung des Haarzyklus verantwortlich zu machen, da auch hier die zu große Entfernung von dermalen Papille und Haarmatrix dagegen spricht. Auch ist während des gesamten Anagens, Katagens und Telogens keine Veränderung der NT-4-Expression in der Epidermis nachweisbar⁴. Demnach wäre eine andere Funktion der Hochregulation von NT-4 durch Zytokine außerhalb des Haarzyklus, wie dies beispielsweise für NT-3 beschrieben ist, denkbar.

Dagegen könnte das Auftreten einzelner NT-4-positiver Zellen in der Haarmatrix und der proximalen äußeren Wurzelscheide durchaus funktionell sehr bedeutsam sein. So zeigen Keratinozyten von äußerer Wurzelscheide und Haarmatrix, aber auch der inneren Wurzelscheide, während des normalen Haarzyklus im Anagen eine Expression von NT-4, die im Katagen noch verstärkt wird⁴. In frühen Stadien des Katagens findet sich auch eine Expression von Trk-B, dem hochaffinen Rezeptor für NT-4 und BDNF, in der dermalen Papille, was wiederum auf die Interaktion zwischen Keratinozyten von Wurzelscheide und Haarmatrix mit den Fibroblasten der dermalen Papille hinweist. Die erhöhte Expression von NT-4 in den Keratinozyten von Haarmatrix und äußerer Wurzelscheide nach Zytokingabe befindet sich also an einer für die Steuerung des Haarzyklus strategisch eminent wichtigen Stelle. Da NT-4 die Herausbildung des Katagens in murinen Haarfollikeln beschleunigt⁴, ist es gut denkbar, daß die

katageninduzierende Wirkung der Zytokine IL-1 β , IFN- γ und TNF- α über eine Veränderung der Expression von NT-4 im Haarfollikel zumindest unterstützt wird und somit hier die Veränderung des Neurotrophinmilieus durch Zytokine für die feinmodulatorische Abstimmung des Haarzyklus von Bedeutung sein könnte.

5.3.5 Cyclosporin A

Für Cyclosporin A wurde in dieser Arbeit ein gleichsinniger Effekt wie für die Zytokine TNF- α , IFN- γ und IL-1 β sowie einen Cocktail aus den 3 Zytokinen nachgewiesen: Nach intraperitonealer Applikation von CsA kam es zu einer deutlichen Hochregulation von NGF in der Haarmatrix und der proximalen äußeren Wurzelscheide. Zytokine und CsA wirken jedoch auf die innere Uhr des Haarzyklus in gegenläufigem Sinne: CsA induziert aktives Haarwachstum (Anagen), dagegen bewirken die genannten Zytokine eine Beschleunigung der Herausbildung von Katagen. Somit scheint eine indirekte Stimulierung der Neurotrophinexpression über die Zytokine unwahrscheinlich, denn CsA inhibiert die untersuchten Zytokine, müßte darüber hinaus also auch die Neurotrophine inhibieren. Daher erscheint hier am wahrscheinlichsten, daß dieser Befund durch eine direkte stimulierende Einflußnahme von CsA auf das Neurotrophinmilieu zustande kommt. Eine direkte positive Wirkung auf die Expression verschiedener Substanzen ist für CsA bereits beschrieben worden²⁰⁶ (siehe 5.6)²⁰⁷.

5.3.6 Dexamethason

Warum Dexamethason keinen Einfluß auf die Neurotrophinexpression zeigte, muß an dieser Stelle ungeklärt bleiben. Denkbar wäre, daß der experimentelle Ansatz nicht ausreichend war, um einen sichtbaren Effekt zu erzeugen. Eventuell könnte eine systemische Behandlung mit Corticosteroiden oder eine höhere Dosierung zu einem anderen Ergebnis führen. Allerdings wäre dann die funktionelle Bedeutung für den Haarwuchs unklar, da Dexamethason schon nach topischer Gabe bei den verwendeten Konzentrationen das Haarwachstum stark beeinflusst^{32,33}. Eine Veränderung des Neurotrophinmilieus nach systemischer Gabe von Corticosteroiden würde daher theoretisch nicht unbedingt mit einer Modifizierung des Haarwuchses zusammenhängen, da die corticosteroidinduzierte Haarwuchsmodulation, wie in diesem Experiment gezeigt, offensichtlich ohne Veränderung der Expression von Neurotrophinen oder ihrer Rezeptoren ablaufen kann.

5.4 Andere Interaktionen von Neurotrophinen und Zytokinen in der Haut

Bisher ist in lediglich einem Tiermodell konkret der Zusammenhang von Zytokinmilieu in der Haut und Expression von Neurotrophinen untersucht worden. In den Arbeiten von Woolf und Safieh-Garabedian wurde an Plantarhaut von Ratten gezeigt, daß sowohl IL-1 β als auch TNF- α im Rahmen eines Entzündungsprozesses die Produktion von NGF durch Keratinozyten stimulieren^{37,38}. Diese Erhöhung von NGF scheint dabei eine wichtige pathophysiologische Rolle in der Entwicklung der Hyperästhesie durch Entzündung zu spielen.

In einem ähnlichen Experiment wurde gezeigt, daß die Injektion von NT-3 diese Entzündungs-induzierte Hyperalgesie vermindern kann, also in diesem Zusammenhang als „Gegenspieler“ von NGF auftritt¹⁷⁸. Dagegen scheinen BDNF und NT-4 ebenfalls die Sensibilisierung von Nozizeptoren und die Herausbildung einer Hyperalgesie zu bewirken, unterstützen also die Hyperalgesie-induzierende Funktion von NGF¹⁷⁹.

Bei Entzündungsprozessen haben Neurotrophine wahrscheinlich noch andere regulatorische Funktionen. Vor allem NGF scheint bei ihnen besonders wichtig zu sein. NGF reguliert *in vivo* die Synthese bestimmter Neuropeptide bei Entzündung der Haut, ist bei einigen entzündlichen Hauterkrankungen vermehrt nachweisbar, erhöht die Zahl der Mastzellen in der Haut und induziert Proliferation und Differenzierung von B-Lymphozyten²¹.

Auf der anderen Seite kann durch UV-Bestrahlung und Gabe von Phorbolesther, welches normalerweise die Expression von Zytokinen verstärkt, die NGF-Produktion in Keratinozyten verändert werden²¹.

Schließlich ist NGF in der Lage, neben seinen Effekten auf die Migration von Melanozyten in der Haut, die UV-induzierte Apoptose von Melanozyten zu verhindern²¹. Dieses wird durch eine Hochregulation des antiapoptotischen BCL-2-Genproduktes erreicht. Welche Rolle bei den zuletzt genannten Beispielen die Zytokine spielen, ist bisher nicht untersucht worden.

In dieser Arbeit ergibt sich also eine weitere Evidenz für das funktionelle Zusammenspiel von Neurotrophinen und proinflammatorischen Zytokinen bei Entzündungsprozessen in der Haut und anderen Organen. Besonders wichtig ist in diesem Zusammenhang die hier beschriebene epidermale Hochregulation von NT-3 und NT-4 nach Gabe des Zytokincocktails aus IL-1 β , IFN- γ und TNF- α , da für NT-3 und NT-4 bereits eine physiologische Funktion in diesem Zusammenhang vermutet wurde (s.o.). Auch im zentralen Nervensystem ist über eine wichtige Aufgabe von NT-3, NGF und BDNF bei Heilungsprozessen nach Verletzungen berichtet worden¹⁸².

5.5 Bedeutung für die Haarforschung

Die Rolle von Neurotrophinen in Biologie und Pathophysiologie der Haut scheint größer zu sein als früher angenommen^{20,21}. Daher ist die hier beschriebene Verbindung von TNF- α , IFN- γ , Il-1 β und Cyclosporin A auf der einen, sowie NGF, NT-3, NT-4 und p75 NTR auf der anderen Seite besonders interessant.

Da Neurotrophine auch als Modulatoren des Haarzyklus wirken^{3-8,136}, ist es denkbar, daß zumindest einige der haarwuchsmodulierenden Effekte von TNF- α , IFN- γ und Il-1 β ^{9-13,188} bzw. Cyclosporin A²⁹⁻³³ mit der Veränderung der Expression von Neurotrophinen oder ihrer Rezeptoren im Haarfollikel im Zusammenhang stehen.

Besonders der Zytokincocktail scheint hier sehr wirkungsvoll zu sein. Wahrscheinlich repräsentiert die Gabe eines Zytokincocktails viel eher die physiologischen Vorgänge während einer Entzündungsreaktion mit Freisetzung sehr vieler Entzündungsmediatoren aus verschiedenen Zelltypen als die Gabe einzelner, isolierter Zytokine.

Für die Haarforschung bedeutet dies, daß auch in Zukunft eine Erforschung des Zusammenhangs zwischen den betrachteten Stoffgruppen sinnvoll ist, um auf der Ebene des Systems Haarfollikel ein Zusammenspiel von Entzündung und Wachstum zu untersuchen. Da die Induktion von Haarwuchs durch Verwundung bzw. Traumata induziert werden kann und bei Kaninchen die Induktion von Haarwuchs mit Wundheilungsprozessen in Zusammenhang zu stehen scheint⁵⁰, ist ein Zusammenspiel von Entzündungsfaktoren und Wachstumsfaktoren auch auf der Ebene des betrachteten Systems Haarfollikel nicht überraschend. Das bedeutet, daß auch für andere Vertreter dieser Substanzgruppen Zusammenhänge zu erwarten sind.

5.6 Bedeutung für die Pathophysiologie der Haut

Diese Arbeit liefert Hinweise dafür, daß entzündliche Hauterkrankungen und ihre Behandlung mit immunsuppressiven Medikamenten wie Cyclosporin A mit deutlichen Veränderungen des Neurotrophinmilieus in der Haut assoziiert sein könnten. Für diese Hypothese ergaben sich bereits in früheren Arbeiten über Psoriasis²⁰⁸, Prurigo nodularis²⁰⁹ und ekzematöser Reaktion²¹⁰ deutliche Hinweise. Einen wichtigen Anteil könnten dabei die Eigenschaften von Neurotrophinen als Modulatoren der Aggregation und Proliferation von Keratinozyten haben^{2,21,22}.

Auch die durch Hautnerven gesteuerte Veränderung der lokalen Freisetzung von Neuropeptiden, welche akute und chronische Entzündungsprozesse regulieren können, kommt als möglicher Pathomechanismus entzündlicher Hauterkrankungen in Frage²¹¹. Der Mediator dieses Prozesses ist wiederum wahrscheinlich NGF. Dies könnte demnach ein Mechanismus sein, der die Wirkung von Neurotrophinen auf entzündliche Hauterkrankungen erklärt. Zusätzlich wäre es ein Modell dafür, wie es zu einer Interaktion von Immunsystem und Nervensystem auf Basis der Neurotrophine in der Haut kommen kann.

Daß durch das Immunsuppressivum Cyclosporin A ebenfalls eine Hochregulation von Neurotrophinen erfolgen kann, ist zunächst erstaunlich, da es auf die Zytokine supprimierend wirkt. Es wäre also zu erwarten, daß CsA einen anderen Effekt auf die Neurotrophinexpression als die Zytokine besitzt, wenn die Zytokine selbst stimulierend auf die Neurotrophine wirken.

Allerdings läßt sich postulieren, daß CsA hier einen direkten, stimulierenden Einfluß ausübt, der mit dem Zytokinmilieu nicht direkt in Zusammenhang steht. Auch andere Signalmoleküle, wie z.B. PDGF (platelet-derived growth factor), oder bestimmte Adhäsionsmoleküle können durch Cyclosporin A hochreguliert werden^{206,207}. Somit wäre denkbar, daß Cyclosporin A nicht nur ein immunsuppressives Medikament ist, sondern auch ein Modulator der Neurotrophinproduktion. Dies könnte für den therapeutischen Einsatz dieses Medikamentes von wichtiger Bedeutung sein, weil Neurotrophine oder eine Modulation des Neurotrophinmilieus, z.B. bei Nervenschädigungen, durchaus Konsequenzen für Entzündungs- und Wundheilungsprozesse haben können, wie dies am Beispiel von peripheren Neuropathien oder Rückenmarksverletzungen bereits gezeigt wurde^{95,181,182}.

5.7 Asymmetrische Verteilung von NGF in der Haarmatrix

Besondere Aufmerksamkeit verdient die Beobachtung des konstant aufgetretenen asymmetrischen Färbemusters von NGF in der Haarmatrix, die bisher noch nicht in publizierten Arbeiten beschrieben wurde. Da die Entwicklung der räumlichen Orientierung bzw. der Asymmetrie von links und rechts eine hohe Bedeutung in der Morphogenese von Organen besitzt^{212,213}, könnte man spekulieren, daß NGF auch für die Etablierung der dreidimensionalen Orientierung von Haarfollikeln wichtig sei. Diese Hypothese wird dadurch unterstützt, daß NGF als ein Beschleuniger der Morphogenese von Haarfollikeln identifiziert werden konnte⁶.

NGF wurde bereits als wichtiger Signalstoff in der Herausbildung einiger Organe beschrieben. Bei der Morphogenese der Niere arbeitet NGF zusammen mit NT-3 und BDNF^{110,111}. An der Steuerung der Zahnentwicklung ist NGF ebenfalls maßgeblich beteiligt¹¹²⁻¹¹⁴. Auch für die Herausbildung der Gliedmaßen, aber auch innerer Organe wie Lunge oder Hoden, kann NGF von Bedeutung sein¹¹⁵.

Demnach könnte NGF nicht nur die Morphogenese von Haarfollikeln beschleunigen, sondern auch eine funktionelle Bedeutung für die räumliche Ausrichtung der Haarfollikel während der Embryonalperiode besitzen, die für ein ordnungsgemäßes Funktionieren dieses Miniorgans nach der Geburt so essentiell wichtig ist.

5.8 Ausblick

In dieser Arbeit konnte ein Zusammenhang von Zytokinen und Neurotrophinen in der Haut von C57BL/6-Mäusen gezeigt werden. Die funktionelle Bedeutung dieser Ergebnisse läßt sich noch nicht genau abschätzen. Der nächste Schritt sollte sinnvollerweise sein, durch Experimente mit transgenen Tieren oder Hautorgankulturen über sie Aufschluß zu erlangen. Wenn die haarwuchsmodulierenden Eigenschaften der Zytokine zumindest teilweise von Neurotrophinen beeinflußt oder sogar über sie vermittelt werden, so müßte bei Neurotrophin-Knockout-Tieren oder nach Behandlung mit Neurotrophin-blockierenden Antikörpern eine verminderte Ansprechbarkeit des Haarwachstums auf Zytokine bestehen. Bei Neurotrophin-überexprimierenden Tieren dagegen oder nach Behandlung mit Neurotrophinen müßte dann vice versa die Katageninduktion durch Zytokine besonders ausgeprägt sein, weil die angenommene unterstützende Funktion der Neurotrophine besser zum Tragen käme.

Daraus könnten sich wichtige therapeutische Konsequenzen und neue zukünftige Therapie-strategien für die Behandlung von Krankheiten des Haarkleides, aber auch anderer, v.a. entzündlicher Erkrankungen der Haut ergeben.

6 Literaturverzeichnis

1. Paus R, Peters EM, Eichmuller S, Botchkarev VA. Neural mechanisms of hair growth control. *J Invest Dermatol Symp Proc* 1997; 2:61-68.
2. Paus R, Luftl M, Czarnetzki BM. Nerve growth factor modulates keratinocyte proliferation in murine skin organ culture. *Br J Dermatol* 1994; 130:174-180.
3. Botchkarev VA, Botchkarev NV, Albers KM, van der Veen, Lewin GR, Paus R. Neurotrophin-3 involvement in the regulation of hair follicle morphogenesis. *J Invest Dermatol* 1998; 111:279-285.
4. Botchkarev VA, Botchkareva NV, Welker P, Metz M, Lewin GR, Subramaniam A, et al. A new role for neurotrophins: involvement of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-4 in hair cycle control. *FASEB J* 1999; 13:395-410.
5. Botchkarev VA, Welker P, Albers KM, Botchkareva NV, Metz M, Lewin GR, et al. A new role for neurotrophin-3: involvement in the regulation of hair follicle regression (catagen). *Am J Pathol* 1998; 153:785-799.
6. Botchkareva NV, Botchkarev VA, Albers KM, Metz M, Paus R. Distinct Roles for Nerve Growth Factor and Brain-Derived Neurotrophic Factor in Controlling the Rate of Hair Follicle Morphogenesis. *J Invest Dermatol* 2000; 114:314-320.
7. Botchkareva NV, Botchkarev VA, Chen LH, Lindner G, Paus R. A role for p75 neurotrophin receptor in the control of hair follicle morphogenesis. *Dev Biol* 1999; 216:135-153.
8. Botchkareva NV, Botchkarev VA, Metz M, Silos-Santiago I, Paus R. Retardation of hair follicle development by the deletion of TrkC, high- affinity neurotrophin-3 receptor. *J Invest Dermatol* 1999; 113:425-427.
9. Philpott MP, Sanders DA, Bowen J, Kealey T. Effects of interleukins, colony-stimulating factor and tumour necrosis factor on human hair follicle growth in vitro: a possible role for interleukin-1 and tumour necrosis factor-alpha in alopecia areata. *Br J Dermatol* 1996; 135:942-948.
10. Hoffmann R. The potential role of cytokines and T cells in alopecia areata. *J Invest Dermatol Symp Proc* 1999; 4:235-238.
11. Hoffmann R, Eicheler W, Huth A, Wenzel E, Happle R. Cytokines and growth factors influence hair growth in vitro. Possible implications for the pathogenesis and treatment of alopecia areata. *Arch Dermatol Res* 1996; 288:153-156.
12. Hoffmann R, Happle R, Paus R. Elements of the interleukin-1 signaling system show hair cycle-dependent gene expression in murine skin. *Eur J Dermatol* 1998; 8:475-477.
13. Harmon CS, Nevins TD. IL-1 alpha inhibits human hair follicle growth and hair fiber production in whole-organ cultures. *Lymphokine Cytokine Res* 1993; 12:197-203.
14. Hattori A, Hayashi K, Kohno M. Tumor necrosis factor (TNF) stimulates the production of nerve growth factor in fibroblasts via the 55-kDa type 1 TNF receptor. *FEBS Lett* 1996; 379:157-160.
15. Hattori A, Iwasaki S, Murase K, Tsujimoto M, Sato M, Hayashi K, et al. Tumor necrosis factor is markedly synergistic with interleukin 1 and interferon-gamma in stimulating the production of nerve growth factor in fibroblasts. *FEBS Lett* 1994; 340:177-180.

16. Hattori A, Tanaka E, Murase K, Ishida N, Chatani Y, Tsujimoto M, et al. Tumor necrosis factor stimulates the synthesis and secretion of biologically active nerve growth factor in non-neuronal cells. *J Biol Chem* 1993; 268:2577-2582.
17. Steiner P, Pfeilschifter J, Boeckh C, Radeke H, Otten U. Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha synergistically stimulate nerve growth factor synthesis in rat mesangial cells. *Am J Physiol* 1991; 261:F792-F798
18. Gadiant RA, Cron KC, Otten U. Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha synergistically stimulate nerve growth factor (NGF) release from cultured rat astrocytes. *Neurosci Lett* 1990; 117:335-340.
19. Lewin GR, Barde YA. Physiology of the neurotrophins. *Annu Rev Neurosci* 1996; 19:289-317.
20. Bothwell M. Neurotrophin function in skin. *J Investig Dermatol Symp Proc* 1997; 2:27-30.
21. Pincelli C, Yaar M. Nerve growth factor: its significance in cutaneous biology. *J Investig Dermatol Symp Proc* 1997; 2:31-36.
22. Botchkarev VA, Metz M, Botchkareva NV, Welker P, Lommatzsch M, Renz H, et al. Brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3, and neurotrophin-4 act as "epitheliotrophins" in murine skin. *Lab Invest* 1999; 79:557-572.
23. Casaccia-Bonneli P, Gu C, Chao MV. Neurotrophins in cell survival/death decisions. *Adv Exp Med Biol* 1999; 468:275-282.
24. Majdan M, Miller FD. Neuronal life and death decisions functional antagonism between the Trk and p75 neurotrophin receptors. *Int J Dev Neurosci* 1999; 17:153-161.
25. Agarwal SK, Marshall GDJ. Glucocorticoid-induced type 1/type 2 cytokine alterations in humans: a model for stress-related immune dysfunction. *J Interferon Cytokine Res* 1998; 18:1059-1068.
26. Bleeker MW, Netea MG, Kullberg BJ, van der Veen, Van der Meer JW. The effects of dexamethasone and chlorpromazine on tumour necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-10 in human volunteers. *Immunology* 1997; 91:548-552.
27. Quesniaux VF. Immunosuppressants: tools to investigate the physiological role of cytokines. *Bioessays* 1993; 15:731-739.
28. Dawson J, Hurtenbach U, MacKenzie A. Cyclosporin A inhibits the in vivo production of interleukin-1beta and tumour necrosis factor alpha, but not interleukin-6, by a T-cell-independent mechanism. *Cytokine*. 1996; 8:882-888.
29. Paus R, Stenn KS, Link RE. The induction of anagen hair growth in telogen mouse skin by cyclosporine A administration. *Lab Invest* 1989; 60:365-369.
30. Yamamoto S, Kato R. Hair growth-stimulating effects of cyclosporin A and FK506, potent immunosuppressants. *J Dermatol Sci* 1994; 7 Suppl:S47-S54
31. Paus R, Bottge JA, Henz BM, Maurer M. Hair growth control by immunosuppression. *Arch Dermatol Res* 1996; 288:408-410.
32. Maurer M, Handjiski B, Paus R. Hair growth modulation by topical immunophilin ligands: induction of anagen, inhibition of massive catagen development, and relative protection from chemotherapy-induced alopecia. *Am J Pathol* 1997; 150:1433-1441.
33. Paus R, Handjiski B, Czarnetzki BM, Eichmuller S. A murine model for inducing and manipulating hair follicle regression (catagen): effects of dexamethasone and cyclosporin A. *J Invest Dermatol* 1994; 103:143-147.

34. Scully JL, Otten U. Glucocorticoid modulation of neurotrophin expression in immortalized mouse hippocampal neurons. *Neurosci Lett* 1993; 155:11-14.
35. Scully JL, Otten U. Neurotrophin expression modulated by glucocorticoids and oestrogen in immortalized hippocampal neurons. *Brain Res Mol Brain Res* 1995; 31:158-164.
36. Cosi C, Spoerri PE, Comelli MC, Guidolin D, Skaper SD. Glucocorticoids depress activity-dependent expression of BDNF mRNA in hippocampal neurones. *Neuroreport* 1993; 4:527-530.
37. Safieh-Garabedian B, Poole S, Allchorne A, Winter J, Woolf CJ. Contribution of interleukin-1 beta to the inflammation-induced increase in nerve growth factor levels and inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol* 1995; 115:1265-1275.
38. Woolf CJ, Allchorne A, Safieh-Garabedian B, Poole S. Cytokines, nerve growth factor and inflammatory hyperalgesia: the contribution of tumour necrosis factor alpha. *Br J Pharmacol* 1997; 121:417-424.
39. Panteleyev AA, Rosenbach T, Paus R, Christiano AM. The bulge is the source of cellular renewal in the sebaceous gland of mouse skin. *Arch Dermatol Res* 2000; 292:573-576.
40. Tobin DJ, Paus R. Graying: gerontobiology of the hair follicle pigmentary unit. *Exp Gerontol* 2001; 36:29-54.
41. Botchkareva NV, Khlgatian M, Longley BJ, Botchkarev VA, Gilchrist BA. SCF/c-kit signaling is required for cyclic regeneration of the hair pigmentation unit. *FASEB J* 2001; 15:645-658.
42. Dry FW. The coat of the mouse (*mus musculus*). *J.Gen.* 1926; (16)287-340.
43. Chase HB. Growth of the hair. *Physiol Rev* 1954; 113-126.
44. Chase HB, Eaton G. The growth of hair follicles in waves. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1959; (83)365-368.
45. Straile WE, Chase HB, Arsenault C. Growth and differentiation of hair follicles between periods of activity and quiescence. *J Exp Zool* 1961; (148)205-216.
46. Paus R, Handjiski B, Czarnetzki BM, Eichmüller S, et al. Biologie des Haarfollikels. *Hautarzt* 1994; 808-825.
47. Paus R. Control of the hair cycle and hair diseases as cycling disorders. *Current Opinion in Dermatology* 1996; 248-258.
48. Montagna W, Ellis RA, eds. *The Biology of Hair Growth*. New York: Academic Press, 1958.
49. Paus R, Cotsarelis G. The biology of hair follicles. *N Engl J Med* 1999; 341:491-497.
50. Stenn KS, Paus R. Controls of hair follicle cycling. *Physiol Rev* 2001; 81:449-494.
51. Panteleyev AA, Paus R, Christiano AM. Patterns of hairless (hr) gene expression in mouse hair follicle morphogenesis and cycling. *Am J Pathol* 2000; 157:1071-1079.
52. Yano K, Brown LF, Detmar M. Control of hair growth and follicle size by VEGF-mediated angiogenesis. *J Clin Invest* 2001; 107:409-417.
53. Van Steensel MA, Happle R, Steijlen PM. Molecular genetics of the hair follicle: the state of the art. *Proc Soc Exp Biol Med* 2000; 223:1-7.
54. Bothwell MA, Shooter EM. Dissociation equilibrium constant of beta nerve growth factor. *J Biol Chem* 1977; 252:8532-8536.
55. Levi-Montalcini R. The nerve growth factor 35 years later. *Science* 1987; 237:1154-1162.

56. Barde YA, Edgar D, Thoenen H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J* 1982; 1:549-553.
57. Maisonpierre PC, Belluscio L, Squinto S, Ip NY, Furth ME, Lindsay RM, et al. Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF. *Science* 1990; 247:1446-1451.
58. Hallbook F, Ibanez CF, Persson H. Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in *Xenopus* ovary. *Neuron* 1991; 6:845-858.
59. Zurn AD, Baetge EE, Hammang JP, Tan SA, Aebischer P. Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), a new neurotrophic factor for motoneurons. *Neuroreport* 1994; 6:113-118.
60. Gotz R, Koster R, Winkler C, Raulf F, Lottspeich F, Scharf M, et al. Neurotrophin-6 is a new member of the nerve growth factor family. *Nature* 1994; 372:266-269.
61. Nilsson AS, Fainzilber M, Falck P, Ibanez CF. Neurotrophin-7: a novel member of the neurotrophin family from the zebrafish. *FEBS Lett* 1998; 424:285-290.
62. Chao M, Casaccia-Bonelli P, Carter B, Chittka A, Kong H, Yoon SO. Neurotrophin receptors: mediators of life and death. *Brain Res Brain Res Rev* 1998; 26:295-301.
63. Bothwell M. Functional interactions of neurotrophins and neurotrophin receptors. *Annu Rev Neurosci* 1995; 18:223-253.
64. Barbacid M. The Trk family of neurotrophin receptors. *J Neurobiol* 1994; 25:1386-1403.
65. Snider WD. Functions of the neurotrophins during nervous system development: what the knockouts are teaching us. *Cell* 1994; 77:627-638.
66. Schlessinger J, Ullrich A. Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases. *Neuron* 1992; 9:383-391.
67. Vetter ML, Martin-Zanca D, Parada LF, Bishop JM, Kaplan DR. Nerve growth factor rapidly stimulates tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma 1 by a kinase activity associated with the product of the *trk* protooncogene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88:5650-5654.
68. Ohmichi M, Decker SJ, Saltiel AR. Activation of phosphatidylinositol-3 kinase by nerve growth factor involves indirect coupling of the *trk* proto-oncogene with src homology 2 domains. *Neuron* 1992; 9:769-777.
69. Radeke MJ, Misko TP, Hsu C, Herzenberg LA, Shooter EM. Gene transfer and molecular cloning of the rat nerve growth factor receptor. *Nature* 1987; 325:593-597.
70. Johnson D, Lanahan A, Buck CR, Sehgal A, Morgan C, Mercer E, et al. Expression and structure of the human NGF receptor. *Cell* 1986; 47:545-554.
71. Rodriguez-Tebar A, Dechant G, Barde YA. Binding of brain-derived neurotrophic factor to the nerve growth factor receptor. *Neuron* 1990; 4:487-492.
72. Chao MV. The p75 neurotrophin receptor. *J Neurobiol* 1994; 25:1373-1385.
73. Dechant G, Barde YA. Signalling through the neurotrophin receptor p75NTR. *Curr Opin Neurobiol* 1997; 7:413-418.
74. Frade JM, Rodriguez-Tebar A, Barde YA. Induction of cell death by endogenous nerve growth factor through its p75 receptor. *Nature* 1996; 383:166-168.
75. Blochl A, Sirrenberg C. Neurotrophins stimulate the release of dopamine from rat mesencephalic neurons via Trk and p75Ltr receptors. *J Biol Chem* 1996; 271:21100-21107.

76. Levi-Montalcini R, Dal Toso R, della VF, Skaper SD, Leon A. Update of the NGF saga. *J Neurol Sci* 1995; 130:119-127.
77. Donnerer J, Schuligoi R, Stein C. Increased content and transport of substance P and calcitonin gene-related peptide in sensory nerves innervating inflamed tissue: evidence for a regulatory function of nerve growth factor in vivo. *Neuroscience* 1992; 49:693-698.
78. Johnson JE, Barde YA, Schwab M, Thoenen H. Brain-derived neurotrophic factor supports the survival of cultured rat retinal ganglion cells. *J Neurosci* 1986; 6:3031-3038.
79. Gonzalez M, Collins WF. Modulation of motoneuron excitability by brain-derived neurotrophic factor. *J Neurophysiol* 1997; 77:502-506.
80. Meyer M, Matsuoka I, Wetmore C, Olson L, Thoenen H. Enhanced synthesis of brain-derived neurotrophic factor in the lesioned peripheral nerve: different mechanisms are responsible for the regulation of BDNF and NGF mRNA. *J Cell Biol* 1992; 119:45-54.
81. Thoenen H. Neurotrophins and neuronal plasticity. *Science* 1995; 270:593-598.
82. Marty S, Berzaghi M, Berninger B. Neurotrophins and activity-dependent plasticity of cortical interneurons. *Trends Neurosci* 1997; 20:198-202.
83. Korte M, Kang H, Bonhoeffer T, Schuman E. A role for BDNF in the late-phase of hippocampal long-term potentiation. *Neuropharmacology* 1998; 37:553-559.
84. Griesbeck O, Canossa M, Campana G, Gartner A, Hoener MC, Nawa H, et al. Are there differences between the secretion characteristics of NGF and BDNF? Implications for the modulatory role of neurotrophins in activity-dependent neuronal plasticity. *Microsc Res Tech* 1999; 45:262-275.
85. Yuen EC, Mobley WC. Therapeutic potential of neurotrophic factors for neurological disorders. *Ann Neurol* 1996; 40:346-354.
86. Henderson CE. Role of neurotrophic factors in neuronal development. *Curr Opin Neurobiol* 1996; 6:64-70.
87. Sendtner M, Holtmann B, Hughes RA. The response of motoneurons to neurotrophins. *Neurochem Res* 1996; 21:831-841.
88. Erickson JT, Conover JC, Borday V, Champagnat J, Barbacid M, Yancopoulos G, et al. Mice lacking brain-derived neurotrophic factor exhibit visceral sensory neuron losses distinct from mice lacking NT4 and display a severe developmental deficit in control of breathing. *J Neurosci* 1996; 16:5361-5371.
89. Conover JC, Erickson JT, Katz DM, Bianchi LM, Poueymirou WT, McClain J, et al. Neuronal deficits, not involving motor neurons, in mice lacking BDNF and/or NT4. *Nature* 1995; 375:235-238.
90. Ernfors P, Lee KF, Jaenisch R. Mice lacking brain-derived neurotrophic factor develop with sensory deficits. *Nature* 1994; 368:147-150.
91. Liu X, Ernfors P, Wu H, Jaenisch R. Sensory but not motor neuron deficits in mice lacking NT4 and BDNF. *Nature* 1995; 375:238-241.
92. Poo MM. Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat Rev Neurosci* 2001; 2:24-32.
93. Nagatsu T, Mogi M, Ichinose H, Togari A. Changes in cytokines and neurotrophins in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl* 2000; 277-290.
94. Macdonald NJ, Decorti F, Pappas TC, Tagliatela G. Cytokine/neurotrophin interaction in the aged central nervous system. *J Anat* 2000; 197 Pt 4:543-551.
95. Apfel SC. Neurotrophic factors in peripheral neuropathies: therapeutic implications. *Brain Pathol* 1999; 9:393-413.

96. Matsuoka I, Meyer M, Thoenen H. Cell-type-specific regulation of nerve growth factor (NGF) synthesis in non-neuronal cells: comparison of Schwann cells with other cell types. *J Neurosci* 1991; 11:3165-3177.
97. Leon A, Buriani A, Dal Toso R, Fabris M, Romanello S, Aloe L, et al. Mast cells synthesize, store, and release nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91:3739-3743.
98. Brodie C. Differential effects of Th1 and Th2 derived cytokines on NGF synthesis by mouse astrocytes. *FEBS Lett* 1996; 394:117-120.
99. Santambrogio L, Benedetti M, Chao MV, Muzaffar R, Kulig K, Gabellini N, et al. Nerve growth factor production by lymphocytes. *J Immunol* 1994; 153:4488-4495.
100. Acheson A, Barker PA, Alderson RF, Miller FD, Murphy RA. Detection of brain-derived neurotrophic factor-like activity in fibroblasts and Schwann cells: inhibition by antibodies to NGF. *Neuron* 1991; 7:265-275.
101. Shibayama E, Koizumi H. Cellular localization of the Trk neurotrophin receptor family in human non-neuronal tissues. *Am J Pathol* 1996; 148:1807-1818.
102. Cartwright M, Mikheev AM, Heinrich G. Expression of neurotrophin genes in human fibroblasts: differential regulation of the brain-derived neurotrophic factor gene. *Int J Dev Neurosci* 1994; 12:685-693.
103. Yaar M, Eller MS, DiBenedetto P, Reenstra WR, Zhai S, McQuaid T, et al. The trk family of receptors mediates nerve growth factor and neurotrophin-3 effects in melanocytes. *J Clin Invest* 1994; 94:1550-1562.
104. Tessarollo L, Tsoulfas P, Martin-Zanca D, Gilbert DJ, Jenkins NA, Copeland NG, et al. trkC, a receptor for neurotrophin-3, is widely expressed in the developing nervous system and in non-neuronal tissues [published erratum appears in *Development* 1993 Aug;118(4):following 1384]. *Development* 1993; 118:463-475.
105. Ernfors P, Lee KF, Jaenisch R. Target derived and putative local actions of neurotrophins in the peripheral nervous system. *Prog Brain Res* 1994; 103:43-54.
106. Ibanez CF, Ernfors P, Timmusk T, Ip NY, Arenas E, Yancopoulos GD, et al. Neurotrophin-4 is a target-derived neurotrophic factor for neurons of the trigeminal ganglion. *Development* 1993; 117:1345-1353.
107. Donovan MJ, Hahn R, Tessarollo L, Hempstead BL. Identification of an essential nonneuronal function of neurotrophin 3 in mammalian cardiac development. *Nat Genet* 1996; 14:210-213.
108. Moore MW, Klein RD, Farinas I, Sauer H, Armanini M, Phillips H, et al. Renal and neuronal abnormalities in mice lacking GDNF. *Nature* 1996; 382:76-79.
109. Sanchez MP, Silos-Santiago I, Frisen J, He B, Lira SA, Barbacid M. Renal agenesis and the absence of enteric neurons in mice lacking GDNF. *Nature* 1996; 382:70-73.
110. Sariola H, Saarma M, Sainio K, Arumae U, Palgi J, Vaahtokari A, et al. Dependence of kidney morphogenesis on the expression of nerve growth factor receptor. *Science* 1991; 254:571-573.
111. Huber LJ, Hempstead B, Donovan MJ. Neurotrophin and neurotrophin receptors in human fetal kidney. *Dev Biol* 1996; 179:369-381.
112. Luukko K, Moshnyakov M, Sainio K, Saarma M, Sariola H, Thesleff I. Expression of neurotrophin receptors during rat tooth development is developmentally regulated, independent of innervation, and suggests functions in the regulation of morphogenesis and innervation. *Dev Dyn* 1996; 206:87-99.

113. Luukko K, Arumae U, Karavanov A, Moshnyakov M, Sainio K, Sariola H, et al. Neurotrophin mRNA expression in the developing tooth suggests multiple roles in innervation and organogenesis. *Dev Dyn* 1997; 210:117-129.
114. Nosrat CA, Fried K, Ebendal T, Olson L. NGF, BDNF, NT3, NT4 and GDNF in tooth development. *Eur J Oral Sci* 1998; 106 Suppl 1:94-99.
115. Wheeler EF, Bothwell M. Spatiotemporal patterns of expression of NGF and the low-affinity NGF receptor in rat embryos suggest functional roles in tissue morphogenesis and myogenesis. *J Neurosci* 1992; 12:930-945.
116. Stanis AM, Stanis JA. Nerve growth factor and neuroimmune interactions in inflammatory diseases. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 917:268-272.
117. Aloe L, Tirassa P, Bracci-Laudiero L. Nerve growth factor in neurological and non-neurological diseases: basic findings and emerging pharmacological perspectives. *Curr Pharm Des* 2001; 7:113-123.
118. Stenn KS, Combates NJ, Eilertsen KJ, Gordon JS, Pardinas JR, Parimoo S, et al. Hair follicle growth controls. *Dermatol Clin* 1996; 14:543-558.
119. Stenn KS, Paus R. What controls hair follicle cycling? *Exp Dermatol* 1999; 8:229-233.
120. Peters EM, Botchkarev VA, Botchkareva NV, Tobin DJ, Paus R. Hair-cycle-associated remodeling of the peptidergic innervation of murine skin, and hair growth modulation by neuropeptides. *J Invest Dermatol* 2001; 116:236-245.
121. Peters EM, Maurer M, Botchkarev VA, Gordon DS, Paus R. Hair growth-modulation by adrenergic drugs. *Exp Dermatol* 1999; 8:274-281.
122. Botchkarev VA, Peters EM, Botchkareva NV, Maurer M, Paus R. Hair cycle-dependent changes in adrenergic skin innervation, and hair growth modulation by adrenergic drugs. *J Invest Dermatol* 1999; 113:878-887.
123. Crowley C, Spencer SD, Nishimura MC, Chen KS, Pitts-Meek S, Armanini MP, et al. Mice lacking nerve growth factor display perinatal loss of sensory and sympathetic neurons yet develop basal forebrain cholinergic neurons. *Cell* 1994; 76:1001-1011.
124. Albers KM, Wright DE, Davis BM. Overexpression of nerve growth factor in epidermis of transgenic mice causes hypertrophy of the peripheral nervous system. *J Neurosci* 1994; 14:1422-1432.
125. Bergman E, Ulfhake B, Fundin BT. Regulation of NGF-family ligands and receptors in adulthood and senescence: correlation to degenerative and regenerative changes in cutaneous innervation. *Eur J Neurosci* 2000; 12:2694-2706.
126. Di Marco E, Marchisio PC, Bondanza S, Franzi AT, Cancedda R, De Luca M. Growth-regulated synthesis and secretion of biologically active nerve growth factor by human keratinocytes. *J Biol Chem* 1991; 266:21718-21722.
127. Pincelli C, Marconi A. Autocrine nerve growth factor in human keratinocytes [In Process Citation]. *J Dermatol Sci* 2000; 22:71-79.
128. Pincelli C, Yaar M. Nerve growth factor: its significance in cutaneous biology. *J Investig Dermatol Symp Proc* 1997; 2:31-36.
129. Lewin GR. Neurotrophins and the specification of neuronal phenotype. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1996; 351:405-411.
130. Davies AM, Bandtlow C, Heumann R, Korsching S, Rohrer H, Thoenen H. Timing and site of nerve growth factor synthesis in developing skin in relation to innervation and expression of the receptor. *Nature* 1987; 326:353-358.

131. Botchkarev VA, Botchkareva NV, Lommatzsch M, Peters EM, Lewin GR, Subramaniam A, et al. BDNF overexpression induces differential increases among subsets of sympathetic innervation in murine back skin. *Eur J Neurosci* 1998; 10:3276-3283.
132. Botchkarev VA, Kief S, Paus R, Moll I. Overexpression of brain-derived neurotrophic factor increases Merkel cell number in murine skin [letter]. *J Invest Dermatol* 1999; 113:691-692.
133. Fundin BT, Silos-Santiago I, Ernfors P, Fagan AM, Aldskogius H, DeChiara TM, et al. Differential dependency of cutaneous mechanoreceptors on neurotrophins, trk receptors, and P75 LNGFR. *Dev Biol* 1997; 190:94-116.
134. Airaksinen MS, Koltzenburg M, Lewin GR, Masu Y, Helbig C, Wolf E, et al. Specific subtypes of cutaneous mechanoreceptors require neurotrophin-3 following peripheral target innervation. *Neuron* 1996; 16:287-295.
135. Albers KM, Perrone TN, Goodness TP, Jones ME, Green MA, Davis BM. Cutaneous overexpression of NT-3 increases sensory and sympathetic neuron number and enhances touch dome and hair follicle innervation. *J Cell Biol* 1996; 134:487-497.
136. Botchkarev VA, Botchkareva NV, Albers KM, Chen LH, Welker P, Paus R. A role for p75 neurotrophin receptor in the control of apoptosis-driven hair follicle regression. *FASEB J* 2000; 14:1931-1942.
137. Yardley G, Relf B, Lakshmanan J, Reinshagen M, Moore GP. Expression of nerve growth factor mRNA and its translation products in the anagen hair follicle. *Exp Dermatol* 2000; 9:283-289.
138. Curfs JH, Meis JF, Hoogkamp-Korstanje JA. A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10:742-780.
139. Barrett KE. Cytokines: sources, receptors and signalling. *Baillieres Clin Gastroenterol* 1996; 10:1-15.
140. Mui AL, Miyajima A. Cytokine receptors and signal transduction. *Prog Growth Factor Res* 1994; 5:15-35.
141. Taga T, Kishimoto T. Cytokine receptors and signal transduction. *FASEB J* 1992; 6:3387-3396.
142. Roitt, Brostoff, Male. *Immunology*. 5 ed. London: Mosby, 1998.
143. Stadnyk AW. Cytokine production by epithelial cells. *FASEB J* 1994; 8:1041-1047.
144. Arai KI, Lee F, Miyajima A, Miyatake S, Arai N, Yokota T. Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses. *Annu Rev Biochem* 1990; 59:783-836.
145. Sporn MB, Roberts AB. Peptide growth factors are multifunctional. *Nature* 1988; 332:217-219.
146. Cohen MC, Cohen S. Cytokine function: a study in biologic diversity. *Am J Clin Pathol* 1996; 105:589-598.
147. Ihle JN. Cytokine receptor signalling. *Nature* 1995; 377:591-594.
148. Kishimoto T, Taga T, Akira S. Cytokine signal transduction. *Cell* 1994; 76:253-262.
149. Darnell JEJ, Kerr IM, Stark GR. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 1994; 264:1415-1421.
150. Clerk A, Harrison JG, Long CS, Sugden PH. Pro-inflammatory cytokines stimulate mitogen-activated protein kinase subfamilies, increase phosphorylation of c-Jun and ATF2 and upregulate c-Jun protein in neonatal rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 1999; 31:2087-2099.
151. Oppenheim JJ, Zachariae CO, Mukaida N, Matsushima K. Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. *Annu Rev Immunol* 1991; 9:617-648.

152. Kupper RW, Dewald B, Jakobs KH, Baggiolini M, Gierschik P. G-protein activation by interleukin 8 and related cytokines in human neutrophil plasma membranes. *Biochem J* 1992; 282 (Pt 2):429-434.
153. Gemsa, Kalden, Resch. *Immunologie*. 3 ed. Stuttgart, New York: Georg Thieme, 1991.
154. Burke F, Naylor MS, Davies B, Balkwill F. The cytokine wall chart. *Immunol Today* 1993; 14:165-170.
155. Dinarello CA. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood* 1991; 77:1627-1652.
156. Dinarello CA. Modalities for reducing interleukin 1 activity in disease. *Immunol Today* 1993; 14:260-264.
157. Arend WP. Interleukin-1 receptor antagonist. *Adv Immunol* 1993; 54:167-227.
158. McKean DJ, Huntoon C, Bell M. Ligand-induced desensitization of interleukin 1 receptor-initiated intracellular signaling events in T helper lymphocytes. *J Exp Med* 1994; 180:1321-1328.
159. Dinarello CA, Thompson RC. Blocking IL-1: interleukin 1 receptor antagonist in vivo and in vitro. *Immunol Today* 1991; 12:404-410.
160. Arend WP, Smith MFJ, Janson RW, Joslin FG. IL-1 receptor antagonist and IL-1 beta production in human monocytes are regulated differently. *J Immunol* 1991; 147:1530-1536.
161. Arend WP, Malyak M, Guthridge CJ, Gabay C. Interleukin-1 receptor antagonist: role in biology. *Annu Rev Immunol* 1998; 16:27-55.
162. Fiers W. Tumor necrosis factor. Characterization at the molecular, cellular and in vivo level. *FEBS Lett* 1991; 285:199-212.
163. Vassalli P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol* 1992; 10:411-452.
164. Brouckaert P, Libert C, Everaerd B, Takahashi N, Cauwels A, Fiers W. Tumor necrosis factor, its receptors and the connection with interleukin 1 and interleukin 6. *Immunobiology* 1993; 187:317-329.
165. Higuchi M, Aggarwal BB. Differential roles of two types of the TNF receptor in TNF-induced cytotoxicity, DNA fragmentation, and differentiation. *J Immunol* 1994; 152:4017-4025.
166. Wang B, Kondo S, Shivji GM, Fujisawa H, Mak TW, Sauder DN. Tumour necrosis factor receptor II (p75) signalling is required for the migration of Langerhans' cells. *Immunology* 1996; 88:284-288.
167. Tartaglia LA, Goeddel DV. Two TNF receptors. *Immunol Today* 1992; 13:151-153.
168. Farrar MA, Schreiber RD. The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. *Annu Rev Immunol* 1993; 11:571-611.
169. Platanias LC. Interferons: laboratory to clinic investigations. *Curr Opin Oncol* 1995; 7:560-565.
170. Heese K, Hock C, Otten U. Inflammatory signals induce neurotrophin expression in human microglial cells. *J Neurochem* 1998; 70:699-707.
171. Friedman WJ, Larkfors L, Ayer-LeLievre C, Ebendal T, Olson L, Persson H. Regulation of beta-nerve growth factor expression by inflammatory mediators in hippocampal cultures. *J Neurosci Res* 1990; 27:374-382.
172. Lucarelli E, Kaplan DR, Thiele CJ. Selective regulation of TrkA and TrkB receptors by retinoic acid and interferon-gamma in human neuroblastoma cell lines. *J Biol Chem* 1995; 270:24725-24731.
173. Patterson JC, Childs GV. Nerve growth factor in the anterior pituitary: regulation of secretion. *Endocrinology* 1994; 135:1697-1704.

174. Carman-Krzan M, Vige X, Wise BC. Regulation by interleukin-1 of nerve growth factor secretion and nerve growth factor mRNA expression in rat primary astroglial cultures. *J Neurochem* 1991; 56:636-643.
175. Lindholm D, Heumann R, Meyer M, Thoenen H. Interleukin-1 regulates synthesis of nerve growth factor in non-neuronal cells of rat sciatic nerve. *Nature* 1987; 330:658-659.
176. Manni L, Aloe L. Role of IL-1 beta and TNF-alpha in the regulation of NGF in experimentally induced arthritis in mice. *Rheumatol Int* 1998; 18:97-102.
177. Safieh-Garabedian B, Poole S, Allchorne A, Winter J, Woolf CJ. Contribution of interleukin-1 beta to the inflammation-induced increase in nerve growth factor levels and inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol* 1995; 115:1265-1275.
178. Watanabe M, Endo Y, Kimoto K, Katoh-Semba R, Arakawa Y. Inhibition of adjuvant-induced inflammatory hyperalgesia in rats by local injection of neurotrophin-3. *Neurosci Lett* 2000; 282:61-64.
179. Shu XQ, Mendell LM. Neurotrophins and hyperalgesia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:7693-7696.
180. Marshall JS, Gomi K, Blennerhassett MG, Bienenstock J. Nerve growth factor modifies the expression of inflammatory cytokines by mast cells via a prostanoid-dependent mechanism. *J Immunol* 1999; 162:4271-4276.
181. Otten U, Marz P, Heese K, Hock C, Kunz D, Rose-John S. Cytokines and neurotrophins interact in normal and diseased states. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 917:322-330.
182. Hayashi M, Ueyama T, Nemoto K, Tamaki T, Senba E. Sequential mRNA expression for immediate early genes, cytokines, and neurotrophins in spinal cord injury. *J Neurotrauma* 2000; 17:203-218.
183. Braun A, Lommatzsch M, Lewin GR, Virchow JC, Renz H. Neurotrophins: a link between airway inflammation and airway smooth muscle contractility in asthma? *Int Arch Allergy Immunol* 1999; 118:163-165.
184. Paus R, Christoph T, Muller-Rover S. Immunology of the hair follicle: a short journey into terra incognita [In Process Citation]. *J Investig Dermatol Symp Proc* 1999; 4:226-234.
185. Boehm KD, Yun JK, Strohl KP, Elmetts CA. Messenger RNAs for the multifunctional cytokines interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha are present in adnexal tissues and in dermis of normal human skin. *Exp Dermatol* 1995; 4:335-341.
186. Groves RW, Mizutani H, Kieffer JD, Kupper TS. Inflammatory skin disease in transgenic mice that express high levels of interleukin 1 alpha in basal epidermis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92:11874-11878.
187. Cork MJ, Crane AM, Duff GW. Genetic control of cytokines. Cytokine gene polymorphisms in alopecia areata. *Dermatol Clin* 1996; 14:671-678.
188. Ruckert R, Lindner G, Bulfone-Paus S, Paus R. High-dose proinflammatory cytokines induce apoptosis of hair bulb keratinocytes in vivo. *Br J Dermatol* 2000; 143:1036-1039.
189. Han CW, Imamura M, Hashino S, Zhu X, Tanaka J, Imai K, et al. Differential effects of the immunosuppressants cyclosporin A, FK506 and KM2210 on cytokine gene expression. *Bone Marrow Transplant*. 1995; 15:733-739.
190. Losa GJ, Mateos RF, Jimenez LA, Garcia SM, Martin-de CM, Perez LJ, et al. Effect of cyclosporin A on inflammatory cytokine production by human alveolar macrophages. *Respir.Med.* 1998; 92:722-728.
191. Marionnet AV, Chardonnet Y, Viac J, Schmitt D. Differences in responses of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha production and secretion to cyclosporin-A and ultraviolet B-irradiation by normal and transformed keratinocyte cultures. *Exp.Dermatol* 1997; 6:22-28.

192. Fiedler VC, Alaiti S. Treatment of alopecia areata. *Dermatol Clin* 1996; 14:733-737.
193. Stenn KS, Paus R, Dutton T, Sarba B. Glucocorticoid effect on hair growth initiation: a reconsideration. *Skin Pharmacol* 1993; 6:125-134.
194. Niu H, Hinkle DA, Wise PM. Dexamethasone regulates basic fibroblast growth factor, nerve growth factor and S100beta expression in cultured hippocampal astrocytes. *Brain Res Mol Brain Res* 1997; 51:97-105.
195. Braun A, Appel E, Baruch R, Herz U, Botchkarev V, Paus R, et al. Role of nerve growth factor in a mouse model of allergic airway inflammation and asthma. *Eur J Immunol* 1998; 28:3240-3251.
196. Roth W, Deussing J, Botchkarev VA, Pauly-Evers M, Saftig P, Hafner A, et al. Cathepsin L deficiency as molecular defect of furless: hyperproliferation of keratinocytes and perturbation of hair follicle cycling. *FASEB J* 2000; 14:2075-2086.
197. Paus R, Stenn KS, Link RE. Telogen skin contains an inhibitor of hair growth. *Br J Dermatol* 1990; 122:777-784.
198. Slominski A, Paus R. Melanogenesis is coupled to murine anagen: towards new concepts for the role of melanocytes and the regulation of melanogenesis in hair growth. *J Invest Dermatol*. 1993; (101)90s-97s.
199. Paus R, Hofmann U, Eichmuller S, Czarnetzki BM. Distribution and changing density of gamma-delta T cells in murine skin during the induced hair cycle. *Br J Dermatol* 1994; 130:281-289.
200. Ruckert R, Hofmann U, van der Veen, Bulfone-Paus S, Paus R. MHC class I expression in murine skin: developmentally controlled and strikingly restricted intraepithelial expression during hair follicle morphogenesis and cycling, and response to cytokine treatment in vivo. *J Invest Dermatol* 1998; 111:25-30.
201. Botchkarev VA, Eichmuller S, Johansson O, Paus R. Hair cycle-dependent plasticity of skin and hair follicle innervation in normal murine skin. *J Comp Neurol* 1997; 386:379-395.
202. Bortz J. *Lehrbuch der empirischen Forschung*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer, 1984.
203. Lindholm D, Heumann R, Hengerer B, Thoenen H. Interleukin 1 increases stability and transcription of mRNA encoding nerve growth factor in cultured rat fibroblasts. *J Biol Chem* 1988; 263:16348-16351.
204. Lindholm D, Heumann R, Meyer M, Thoenen H. Interleukin-1 regulates synthesis of nerve growth factor in non-neuronal cells of rat sciatic nerve. *Nature* 1987; 330:658-659.
205. Jahoda CA, Reynolds AJ. Dermal-epidermal interactions. Adult follicle-derived cell populations and hair growth. *Dermatol Clin* 1996; 14:573-583.
206. Nares S, Ng MC, Dill RE, Park B, Cutler CW, Iacopino AM. Cyclosporine A upregulates platelet-derived growth factor B chain in hyperplastic human gingiva. *J Periodontol* 1996; 67:271-278.
207. Ihm CG, Hong SP, Park JK, Lee TW, Cho BS, Yang MH, et al. Effects of mixed leukocyte reaction, hydrocortisone and cyclosporine on expression of leukocyte adhesion molecules by endothelial and mesangial cells. *J Korean Med Sci* 1996; 11:495-500.
208. Raychaudhuri SP, Jiang WY, Farber EM. Psoriatic keratinocytes express high levels of nerve growth factor. *Acta Derm Venereol* 1998; 78:84-86.
209. Liang Y, Marcusson JA, Johansson O. Light and electron microscopic immunohistochemical observations of p75 nerve growth factor receptor-immunoreactive dermal nerves in prurigo nodularis. *Arch Dermatol Res* 1999; 291:14-21.

210. Giannetti A. Neuropeptides, nerve growth factor and eczema. *Australas J Dermatol* 1996; 37 Suppl 1:S1-S3
211. Pincelli C, Fantini F, Giannetti A. Neuropeptides, nerve growth factor and the skin. *Pathol Biol (Paris)* 1996; 44:856-859.
212. Tamura K, Yonei-Tamura S, Belmonte JC. Molecular basis of left-right asymmetry. *Dev Growth Differ* 1999; 41:645-656.
213. Supp DM, Brueckner M, Potter SS. Handed asymmetry in the mouse: understanding how things go right (or left) by studying how they go wrong. *Semin Cell Dev Biol* 1998; 9:77-87.

Danksagung

Mein herzlichster Dank gilt allen, die mir bei der Erstellung dieser Arbeit geholfen haben. Besonders möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Ralf Paus für die gute Betreuung und Supervision bedanken. Für die vielen fachlichen Ratschläge und Unterstützungen bedanke ich mich auch bei meinem Betreuer Vladimir A. Botchkarev. Zu Dank bin ich besonders Ruth Plieth verpflichtet, die in vielen praktischen Fragen eine unverzichtbare Hilfe war und durch ihre nette und herzliche Art ein angenehmes Arbeitsklima schuf. Auch das kollegiale Verhältnis in der „Arbeitsgruppe Haarforschung“ hat einen großen Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Schließlich möchte ich meinen Eltern und meiner Lebensgefährtin Mirjam Hengst danken, die mich in vielfältiger Hinsicht unterstützt haben und ohne deren Zutun diese Arbeit nicht hätte zustandekommen können.

Lebenslauf

24. Juni 1972	geboren in Berlin
1979 bis 1987	Besuch der Polytechnischen Oberschule „Harro Schulze-Boysen“ in Berlin-Lichtenberg
1987 bis 1991	Besuch der Erweiterten Oberschule „Immanuel Kant“ in Berlin-Lichtenberg und Erlangen der Hochschulreife
1991 bis 1992	Zivildienst im Krankenhaus „Königin Elisabeth-Herzberge“ in Berlin
Oktober 1992	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Freien Universität Berlin
September 1994	Ärztliche Vorprüfung
April 1995 bis September 1998	Arbeit als Tutor im Institut für Physiologie der FU Berlin
August 1995	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
WS 1995/96	Hochschulwechsel an die Humboldt-Universität zu Berlin
November 1995 bis Juli 1996	Auslandsstudium in Bristol/ England im Rahmen des ERASMUS Austauschprogrammes, Praktika in Truro und Exeter
April 1998	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung Beginn der Dissertation bei der AG Paus (Haarforschung) im Virchow-Klinikum
Oktober 1998 bis September 1999	Praktisches Jahr <ul style="list-style-type: none"> - Innere Medizin, Prof. Landgraf, Wenckebach Krankenhaus - Chirurgie, Prof. Diana, Policlinico Universitario „Paolo Giaccone“, Palermo - Neurologie, Dr. Christe, Klinikum Ernst von Bergmann, Potsdam
Oktober 1999	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Seit August 2000	AiP in der Neurologie im Klinikum Ernst von Bergmann, Potsdam

Publikationsliste

Posterpräsentation auf dem Treffen der Arbeitsgemeinschaft dermatologische Forschung (ADF)
18. bis 20. Februar 1999 in Bonn:

**“Proinflammatory Cytokines and Cyclosporin A Alter the Intra- and Extrafollicular
Expression of Neurotrophins and Neurotrophin Receptors in Murine Skin in Vivo”**

H. Bläsing, V. Botchkarev, R. Plieth, R. Rückert, R. Paus

Posterpräsentation auf dem Jahrestreffen der European Society for Dermatological Research
(ESDR) 21. bis 23. September 2000 in Berlin:

**“Intraepidermal and Intrafollicular Cross-Talk between Pro-inflammatory Cytokines and
Neurotrophins?”**

H. Bläsing, R. Rückert, R. Paus

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, daß die Dissertation von mir selbst und ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfaßt wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.